

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ÁGATHA CRISTHINA DE OLIVEIRA FARIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES CROMOSSÔMICAS E GENES  
ENVOLVIDOS NA CRANIOSSINOSTOSE**

VITÓRIA  
2014

**ÁGATHA CRISTHINA DE OLIVEIRA FARIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES CROMOSSOMICAS E GENES  
ENVOLVIDOS NA CRANIOSSINOSTOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra Flávia Imbroisi  
Valle Errera

VITÓRIA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

---

"Identificação de Regiões Cromossômicas e Genes Envolvidos na  
Craniossinostose"

Ágatha Cristhina Oliveira Faria

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada por:

A handwritten signature in blue ink, reading "Flávia Imbroisi Valle Errera", written over a horizontal line.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Flávia Imbroisi Valle Errera (UFES)

Orientadora

A handwritten signature in blue ink, reading "Flávia de Paula", written over a horizontal line.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Flávia de Paula (UFES)

Membro Interno

A handwritten signature in blue ink, reading "Maria Rita dos Santos e Passos Bueno", written over a horizontal line.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno (USP)

Membro Externo

Vitória-ES, 26 de Março de 2014.

Para todas as pessoas que se vêem incapazes para realizar algo. Essa dissertação  
é prova de que “tudo é possível ao que crê”.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus essa conquista desde o dia em que vi meu nome na lista de aprovados, e vou agradecer por toda a minha vida. Porque por d'Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais, pelo empenho e dedicação em me criar, por terem me ensinado a estudar, a lutar pelos meus sonhos, e acima de tudo confiar em Deus e andar nos caminhos d'Ele e também por sempre acreditarem e apoiarem minhas escolhas. Agradeço também ao meu padrasto Victor e a minha madrasta Joyce que são companheiros dos meus pais e também torcem por mim. Essa vitória é de vocês!

À minha irmãzinha e meu priminho que convivem comigo, compartilharam meus dias felizes, tristes, e agüentaram minhas crises pré-defesa. Obrigada por cuidarem da casa no meu lugar.

Ao Pablo, meu argentino preferido por torcer e acreditar em mim mesmo de longe. E também por traduzir todos os meus textos para o inglês. Muchas gracias hermosinho!

Aos “amigos adoradores” que foram essenciais em todos os meus dias durante o mestrado: Mamãe, Isabella, Pri, Jordana, amigo Wagner, meu teacher preferido, Stela, Paula, Michel e os outros agregados. Não há dúvidas nem clichê em dizer que sem vocês eu não sei onde estaria. Compartilhamos nossas alegrias e tristezas diárias, e sem a oração, apoio e amizade de vocês, eu não seria eu.

Às Amigas Raquel e Elaine, por tudo! Palavras não vão expressar a intensidade da nossa amizade e a gratidão que sinto por toda a ajuda. Só posso agradecer a Deus todos os dias a amizade de vocês. Vocês são muito mais que especiais pra mim, muito obrigada sempre! E que venham muitos dias de ryquezza na nossa nova mansão.

Um parágrafo especial em agradecimento ao meu ex teacher preferido que não mediu e nem mede esforços para me ajudar e em quem eu sei que posso contar com a ajuda em qualquer situação (inclusive em um de domingo de madrugada)

Aos meus outros amigos de longa data, que mesmo de longe acompanharam a saga do mestrado e torceram por mim. Em especial as B's e P's, Rafa e Tarci e ao Jean, meu brother.

À Karine e Aline, que receberam de braços abertos uma mestrande de 20 anos perdida que nunca tinha feito Iniciação Científica sem preconceitos e a ensinaram o Bê-a-bá de um laboratório e os “pulos do gato” da vida acadêmica. Vocês foram minhas grandes companheiras e professoras no primeiro ano de mestrado. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Genética Humana e Molecular da EMESCAM, principalmente Iara, Wenderson e Josi pelo companheirismo, amizade e brincadeiras que fizeram e fazem o clima do laboratório estar sempre “pra cima” e os dias de pesquisa mais agradáveis.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa da EMESCAM por serem ótimas pessoas com quem se conviver, e fazem o ambiente de trabalho familiar e agradável.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia Imbroisi Valle Errera, por ter me escolhido como orientanda mesmo sabendo da minha falta de experiência, pelo apoio, compreensão e incentivo nas horas de dificuldade e por sempre acreditar no nosso projeto.

À Dr<sup>a</sup> Eliete Rabbi Bortolini, por amigavelmente e com dedicação sempre ajudar, orientar e agregar conhecimento ao projeto.

À prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rita dos Santos e Passos Bueno por gentilmente ceder seus pacientes, pelas sábias orientações e por ter me dado a oportunidade de conviver no seu laboratório, onde se vive e respira ciência 24h por dia.

Aos alunos do Laboratório de Genética do Desenvolvimento da Universidade de São Paulo, por terem me recebido sem preconceitos, sempre dispostos a ajudar, especialmente ao Atique, por me apresentar a Craniossinostose e sempre responder aos meus emails desesperados com muita paciência.

Às especialistas Silvia e Naila por terem me ensinado o aCGH e o MLPA com muita paciência e solicitude, e pela prontidão em sanar minhas dúvidas.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e aos seus membros, por possibilitarem a oportunidade de realização do Mestrado em Biotecnologia.

Aos membros da banca de defesa, prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia de Paula e prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rita Passos e Bueno por aceitarem o convite.

Aos pais dos pacientes por permitirem o estudo, principalmente a Enilda.

Às agências de apoio e financiamento: FAPES e CNPq.

*“Para que todos vejam e saibam, considerem e juntamente entendam que a mão do  
SENHOR fez isso...”*

**Isaías 41:20**

## RESUMO

Craniossinostose é a segunda anomalia mais comum do desenvolvimento embrionário. Consiste na fusão prematura de uma ou mais suturas do crânio como resultado da diferenciação e proliferação de células do osso da calvária desencadeadas por ativação anormal de vias de sinalização celular durante a embriogênese. As formas sindrômicas correspondem a 30% dos casos, dos quais 30% são explicadas por mutações em um dos oito genes descritos (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *EFNB1*, *POR*, *MSX2*, e *RAB-23*) e 20% são decorrentes de deleções, duplicações ou outras alterações cromossômicas microscópicas. Outra importante causa desse tipo de craniossinostose são as alterações estruturais submicroscópicas, as quais podem ser identificadas somente por técnicas moleculares, principalmente por Hibridização Genômica Comparativa baseada em *Array* (aCGH). O aCGH é uma técnica de alta resolução que permite identificar regiões e alterações genômicas microscópicas e submicroscópicas relacionadas a fenótipos específicos, além de possibilitar a caracterização dos pontos de quebra e levar à identificação de genes candidatos. Com o objetivo de identificar novas regiões cromossômicas e genes envolvidos com craniossinostose foi realizada aCGH em cinco pacientes com craniossinostose associada a outras anomalias congênitas sem diagnóstico definido, sendo dois com escafocefalia, dois com trigonocefalia e um com ambas. Foram identificadas quatro deleções nas regiões 10q26.12-q26.3, 1q21.1, 10q11.22 e 2p25.1-p24.1 e uma duplicação na região 15q13.3, as quais variaram de 0,4 Mb a 12,9 Mb. Os genes candidatos para craniossinostose em 10q26.12-q26.3 foram *FGFR2*, *PTPRE*, *DOCK*, *VENTX*, *NKX-2.1*, *HMX2* e *HMX3*; em 1q21.1, *HYDIN2*, *PDE4DIP*, *HFE2* e *PIAS3*; em 10q11.22 *GDF10* e *GDF2*; e em 2p25.1-p24.1 *MYCN*, *E2F6* e *SMC6*. Somente o gene *CHRNA7*, está presente na região 15q13.3. Há controvérsias sobre consequências fenotípicas das CNVs nessa região, por essa razão não podemos considerá-lo um bom candidato. Além de contribuir para o diagnóstico dos pacientes estudados, a utilização de aCGH possibilitou a identificação de regiões genômicas e potenciais genes envolvidos em dois tipos diferentes de craniossinostose. A principal relevância desse trabalho é que esses genes podem vir a explicar a craniossinostose em outros pacientes.

**Palavras-chave:** Craniossinostose. aCGH. Anomalias Congênitas. Anomalias estruturais submicroscópicas.

## ABSTRACT

Craniosynostosis is the second most common developmental anomaly. It consists in a premature fusion of the skull sutures or more as a result of the differentiation and proliferation of cells from calvaria bone triggered by abnormal activation of cell signaling pathways during embryogenesis. Syndromic forms account for 30% of cases, of which 30% are explained by mutations in one of the eight described genes (FGFR1, FGFR2, FGFR3, TWIST1, EFNB1, IN, MSX2, and RAB-23) and 20% are due to deletions, duplications or other microscopic structural changes. Another important cause of this type of craniosynostosis are submicroscopic structural changes, which can only be identified by molecular techniques, especially by Comparative Genomic Hybridization-based Array (aCGH). The aCGH is a high resolution technique for identifying genomic regions and changes or CNVs related to specific phenotypes, besides enabling the characterization of breakpoints and lead to the identification of candidate genes. Aiming to identify new chromosomal regions and genes involved in craniosynostosis aCGH was performed in five patients with craniosynostosis associated with other congenital anomalies without definitive diagnosis, two with scaphocephaly, two with trigonocephaly and one with both. Four deletions were identified in regions 10q26.12-q26.3, 1q21.1, 10q11.22 and 2p25.1-p24.1 and 15q13.3 duplication in the region, which ranged from 0.4 to 12.9 Mb Mb. The candidate genes for craniosynostosis in 10q26.12-q26.3 were FGFR2, PTPRE, DOCK, VENTX, *NKX-2.1*, HMX2 and HMX3; in 1q21.1 HYDIN2, PDE4DIP, PIAS3 and HFE2; in 10q11.22 GDF10 and GDF2; and from 2p25.1-p24.1 MYCN, E2F6 and SMC6. Only CHRNA7 is present in 15q13.3. There is controversy over phenotypic consequences of CNVs in this region for this reason we cannot consider it a good candidate. Besides contributing to the diagnosis of the patients, the use of aCGH allowed the identification of potential genomic regions and genes involved in two different types of craniosynostosis. The main significance of this work is that these genes are likely to explain the craniosynostosis in other patients.

**Keywords:** Craniosynostosis. aCGH. Congenital anomalies. Submicroscopic structural abnormalities.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração das diferentes células envolvidas na osteogênese da sutura cranial.	20
Figura 2 - Representação ilustrativa dos tipos de fechamento das suturas.....	22
Figura 3 - Ilustrações de uma duplicação e dos tipos de deleções.....	26
Figura 4 - Técnica de Hibridização Genômica Comparativa em Array (aCGH).....	33
Figura 5 - Fotos da paciente 1.....	44
Figura 6 - Fotos da mão da paciente 1.....	45
Figura 7 - Tomografia computadorizada 3D do crânio da paciente 1.....	45
Figura 8 - Resultados do MLPA paciente 1 e dos seus pais.....	47
Figura 9 - A. Ideograma do cromossomo 10 mostrando a posição da deleção no braço longo (retângulo). Em detalhe, os genes localizados na área deletada. B. Perfil do aCGH no cromossomo 10 do paciente. A seta destaca o sítio da deleção. C. Visão em alta resolução do segmento deletado de 12,967,989 bp 10q26.12-q26.3.....	48
Figura 10 - A. Ideograma do cromossomo 10 mostrando a posição da deleção no braço longo (barra). B. O traço destaca região onde houve quebra na região 10:122.085.501 onde nenhum gene foi quebrado. C. O traço destaca o Íntron do gene PAOX onde ocorreu a 2ª quebra (10;135.053.489).....	49
Figura 11 – Fotos do paciente 2.....	52

Figura 12 - A. Ideograma do cromossomo 1 mostrando a posição da deleção no braço longo (barra). Em detalhe, os genes localizados na área deletada. B. Perfil do aCGH no cromossomo 1 do paciente. A seta destaca o sítio da deleção. C. Visão de alta resolução do segmento deletado de 1,5 Mb na região 1q21.1..... 53

Figura 13 - Ideograma do cromossomo 1 mostrando a posição da deleção no braço longo (barra). A. A linha destaca região onde houve quebra na região 1:144,785,370. B. A linha destaca a região de quebra onde ocorreu a 2ª quebra, região 1:146,294,653..... 53

Figura 14 – Fotos do paciente 3..... 55

Figura 15 - A. Ideograma do cromossomo 10 mostrando a posição da deleção no braço longo (barra). Em detalhe, os genes localizados na área deletada. B. Perfil do aCGH no cromossomo 10 do paciente. A seta destaca o sítio da deleção. C. Visão de alta resolução do segmento deletado de 0,625 Mb na região 10q11.22..... 56

Figura 16 - Ideograma do cromossomo 1 mostrando a posição da deleção no braço longo (barra). A. O traço destaca a região onde houve quebra na região 10:48.395.672. B. O traço destaca a região de quebra onde ocorreu a 2ª quebra, região 10:49.021.064..... 57

Figura 17 - Paciente com 1 ano e 10 meses. Note as orelhas proeminentes, nariz bulboso com columela alongada e narinas alargadas e filtro profundo. Pai com fácies síndrômica..... 58

Figura 18 - A. Ideograma do cromossomo 15 mostrando a posição da duplicação no braço longo (barra). Em detalhe, os genes localizados na área duplicada. B. Perfil do aCGH no cromossomo 15 do paciente. A seta destaca o sítio da deleção. C. Visão de alta resolução do segmento deletado de 0,46 Mb

na região 15q13.3.....	59
------------------------	----

Figura 19 - Ideograma do cromossomo 15 mostrando a posição da duplicação no braço longo (barra). A. O traço destaca região onde houve quebra na região 15:29.852.369. B. O traço destaca a região de quebra onde ocorreu a 2ª quebra, região 15:30.302.249.....	59
---	----

Figura 20 - Diagramas dos resultados de MLPA dos pais do paciente 4 em comparação com uma média populacional no software GeneMarker®.....	60
---	----

Figura 21 - Paciente com 9 anos.....	60
--------------------------------------	----

Figura 22 - A. Ideograma do cromossomo 2 mostrando a posição da deleção no braço curto (retângulo). Em detalhe, os genes localizados na área deletada. B. Perfil do aCGH no cromossomo 2 do paciente. A seta destaca o sítio da deleção. C. Visão de alta resolução do segmento deletado de 9,38 Mb na região 2q13.3.....	61
---	----

Figura 23 - Ideograma do cromossomo 2 mostrando a posição da deleção no braço curto (barra). A. A linha destaca região onde houve quebra na região 10.557.273. B. A linha destaca a região de quebra onde ocorreu a 2ª quebra, região 19.936.826.....	62
---	----

Figura 24 - Diagramas dos resultados dos pais do paciente 5 em comparação com uma média populacional no software GeneMarker®.....	62
---	----



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre classificação cirúrgica e anatômica da craniossinostose.....	20
Tabela 2 – Fatores que influenciam o efeito fenotípico de CNV.....	42
Tabela 3 - Relação de genes RefSeq e OMIM localizados na região 10q26.12-q26.3.....	49
Tabela 4 - Relação dos genes RefSeq e OMIM localizados na região 1q21.1.....	54
Tabela 5 - Relação de genes RefSeq e OMIM localizados na região 10q11.22.....	57
Tabela 6 - Relação de genes localizados na região 15q13.3.....	58
Tabela 7 - Relação de genes RefSeq e OMIM localizados na região 2p25.1-p24.1.....	63

## LISTA DE SIGLAS

AC	Anomalias Congênicas
aCGH	Hibridização Genômica Comparativa Baseada Em Array (Do Inglês, <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i> )
ANKRD35	<i>Ankyrin Repeat Domain 35</i>
ASPM	Abnormal Spindle-Like, Microcephaly-Associated
BAC's	Cromossomos Artificiais De Bactérias (Do Inglês, Bacterial Artificial Chromosome)
BMP2	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
BMP3	<i>Bone Morphogenetic Protein 3</i>
BMP3-b	<i>Bone Morphogenetic Protein 3-b</i>
BMP6	<i>Bone Morphogenetic Protein 6</i>
BMP9	<i>Bone Morphogenetic Protein 9</i>
CALCA	<i>Calcitonin-Related Polypeptide Alpha</i>
CDK5RAP2	<i>Cdk5 Regulatory Subunit-Associated Protein 2</i>
CEGH	Centro De Estudos Do Genoma Humano
CENPJ	<i>γ Tubulin Ring And The Centrosome</i>
CEP	Comitê De Ética Em Pesquisa
CGH	Hibridização Genômica Comparativa (Do Inglês, <i>Comparative Genomic Hybridization</i> )
CHRFAM7A	<i>Chrna7/Fam7a Fusion Gene</i>
CHRNA7	<i>Cholinergic Receptor, Nicotinic, Alpha 7</i>
CIV	Comunicação Intra Ventricular
CNV	Variação Do Número De Cópias (Do Inglês, <i>Copy Number Variation</i> )
DECIPHER	<i>Database Of Chromosomal Imbalance And Phenotype In Humans Using Ensembl Resources</i>
DGV	<i>Database Of Genomic Variants</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Do Inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
DNPM	Atraso Do Desenvolvimento Neuropsicomotor
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético (Do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )

EFNB1	<i>Ephrin-B1</i>
EFNA4	<i>Ephrin-A4</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	<i>Elk-Related Tyrosine Kinase</i>
EMESCAM	<i>Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia</i>
EOAT	<i>Emissões Otoacústicas Evocadas Por Transiente</i>
E2F6	<i>E2F transcription factor 6</i>
FAM7A	<i>family with sequence similarity 7A</i>
FBN1	<i>Fibrillin 1</i>
FISH	<i>Hibridização in situ Fluorescente (Do ingles, Fluorescence in situ hybridization )</i>
FGF's	<i>Fibroblast Growth Factors</i>
FGFR's	<i>Fibroblast Growth Factor Receptors</i>
FGFR2	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2</i>
FGFR3	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i>
FGFR4	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 4</i>
FREM1	<i>FRAS1 Related Extracellular Matrix 1</i>
GDF2	<i>Growth Differentiation Factor 2</i>
GDF3	<i>Growth Differentiation Factor 3</i>
GDF10	<i>Growth Differentiation Factor 10</i>
GNRHR2	<i>Putative Gonadotropin-Releasing Hormone II</i>
HFE2	<i>Hemochromatosis Type 2 (Juvenile)</i>
HMX-2	<i>H6 Family Homeobox 2</i>
HMX-3	<i>H6 Family Homeobox 3</i>
HSCMV	<i>Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória</i>
HUCAM	<i>Hospital das Clínicas Antônio de Moraes</i>
HYDIN2	<i>Hydrocephalus-Inducing Homolog Of Mouse 2</i>
IB-USP	<i>Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo</i>
IGF	<i>Insulin-Like Growth Factor</i>
ISCN	<i>International Sustainable Campus Network</i>
ITGA10	<i>Integrin Alpha-10</i>
JAG1	<i>Jagged 1</i>
LCRs	<i>Low-Copy Repeats,</i>

LINC00954	<i>Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 954</i>
LIX1L	<i>Lix1 Homolog (Mouse)-Like</i>
LRIT3	<i>Leucine-Rich Repeat, Immunoglobulin-Like And Transmembrane Domains 3</i>
m-FISH	FISH multicolor (Do inglês, <i>multicolor FISH</i> )
MLPA	Amplificação de Múltiplas Sondas Dependentes de Ligação (Do inglês, <i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i> )
MMP23A	Matrix Metalloproteinase 23 <sup>a</sup>
MMP23B	Matrix Metalloproteinase 23B
MSX2	<i>Muscle Segment Homeobox Homolog Drosophila 2</i>
MYC	<i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene</i>
MYCN	<i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral-Related Oncogene, Neuroblastoma-Derived</i>
NAHR	Recombinações Homólogas Não Alélicas (Do inglês, <i>Non Allelic Homologous Recombination</i> )
NBPF's	<i>Neuroblastoma Breakpoint Family</i>
NBPF8	<i>Neuroblastoma Breakpoint Family, Member 8</i>
NBPF9	<i>Neuroblastoma Breakpoint Family, Member 9</i>
NBPF10	<i>Neuroblastoma Breakpoint Family, Member 10</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGRL	<i>National Genetics Reference Laboratories</i>
NKX6-2	<i>NK6 Homeobox 2</i>
NKX1.2	<i>NK1 Homeobox 2</i>
NRN1	<i>5-Prime,3-Prime-Exoribonuclease 1</i>
NSD1	<i>Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1</i>
NUDT17	<i>Nucleoside Diphosphate Linked Moiety X-Type Motif 17</i>
OGT	<i>Oxford Gene Technology</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PAOX	<i>Polyamine Oxidase (exo-N4-amino)</i>
PCA	Persistência do Canal Arterial
PDEPDIP4	<i>Phosphodiesterase 4d Interacting Protein</i>
PEX11B	<i>Peroxisomal Membrane Protein 11B</i>
PIAS3	<i>Protein Inhibitor Of Activated STAT, 3</i>

POLR3C	<i>Polymerase (Rna) Iii (Dna Directed) Polypeptide C</i>
POR	<i>Cytochrome P450 Reductase</i>
PTPN20B	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 20B</i>
PTPRE	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, E</i>
RAB-23	<i>Ras-Related Protein</i>
RBM8A	<i>Rna Binding Motif Protein 8a</i>
RefSeq	<i>Reference Sequence</i>
RNF115	<i>Ring Finger Protein 115</i>
RTK's	<i>Receptores De Tirosina Quinase (Do Inglês, Receptor Tyrosine Kinases)</i>
RUNX2	<i>Runt-Related Transcription Factor 2</i>
SKY	<i>Cariótipo Espectral (Do inglês, Spectral Karyotyping)</i>
SMAD4	<i>Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4</i>
SMC5	<i>Structural Maintenance Of Chromosomes Protein 5</i>
SMC6	<i>Structural Maintenance Of Chromosomes Protein 6</i>
SOX6	<i>Sex Determining Region Y-Box 6</i>
SOX9	<i>Sex Determining Region Y-Box 9</i>
STAT's	<i>Transducer and Activator of Transcription Signal</i>
Src	<i>Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase</i>
TACTILE	<i>Cd96 T-Cell Activation Antigen</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
TGFBR1	<i>Transforming Growth Factor, Beta Receptor I</i>
TGFBR2	<i>Transforming Growth Factor, Beta Receptor II</i>
TLR4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>
TWIST1	<i>Twist Homolog Drosophila 1</i>
UCSC	<i>Genome Bioinformatics Group of University of California, Santa Cruz</i>
VENTX	<i>VENT Homeobox Homolog (Xenopus Laevis)</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Craniossinostose.....	19
1.1.1 <i>Classificação das craniossinostoses</i> .....	21
1.1.2 <i>Etiologia das craniossinostoses</i> .....	22
1.1.2.1 <i>Alterações cromossômicas como causa de craniossinostose</i> .....	24
1.2 Contribuição das alterações cromossômicas para a identificação de regiões e genes envolvidos com craniossinostose.	25
1.3 Métodos de análise de alterações cromossômicas como estratégia para identificação de genes candidatos.....	28
2 OBJETIVOS .....	35
2.1 Objetivo geral .....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3 PACIENTES E MÉTODOS.....	36
3.1 Casuística .....	36
3.2 Avaliação clínico-genética dos indivíduos .....	37
3.3 Coleta de sangue, extração e quantificação do DNA .....	37
3.4 Citogenética clássica.....	38
3.5 Análises moleculares .....	38
3.5.1 <i>MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)</i> ....	39
3.5.2 <i>Comparative Genomic Hybridization array (aCGH)</i> .....	39
3.5.2.1 <i>Análise dos dados</i> .....	41
4 RESULTADOS .....	43
4.1 Paciente 1.....	43
4.1.1 <i>Dados gestacionais, antecedentes e evolução</i> .....	43
4.1.2 <i>Exames físicos</i> .....	43
4.1.3 <i>Exames complementares</i> .....	46
4.2 Pacientes 2, 3, 4 e 5.....	51
4.2.1 <i>Paciente 2</i> .....	51
4.2.2 <i>Paciente 3</i> .....	55
4.2.3 <i>Paciente 4</i> .....	57
4.2.4 <i>Paciente 5</i> .....	60

5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÃO .....	80
7 REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE I .....	93

## **1 INTRODUÇÃO**

As anomalias craniofaciais constituem um grupo altamente diverso e complexo que, em conjunto, afetam uma proporção significativa de pessoas no mundo. Representam cerca de 75% de todas as anomalias congênitas (AC) e incluem, dentre outras, as fissuras orofaciais típicas de lábio e/ou palato e atípicas (fissuras complexas), outras anomalias de linha média, anomalias de primeiro e segundo arcos braquiais e as craniossinostoses (WHO, 2002a; RUBENS, 2010).

### **1.1 Craniossinostose**

Craniossinostose é a fusão prematura de uma ou mais suturas do crânio. Essa fusão é a segunda anomalia mais comum do desenvolvimento, ocorrendo em 1 em 2.500 nascidos vivos, e é resultado da diferenciação e proliferação anormal de células dentro das frentes de crescimento osteogênico do osso da calvária, área constituída de células mesenquimais e osteoprogenitoras, pré-osteoblastos, e osteoblastos (Figura 1)(COUSSENS et al., 2008). A fusão das suturas cranianas ocorre em períodos específicos durante a vida de um indivíduo, e por esse motivo, a ativação anormal de vias de sinalização celular desencadeada por fatores genéticos ou ambientais durante a embriogênese ou no início da infância, pode alterar a abertura das suturas. Pode causar comprometimento de perfusões encefálicas, obstrução de vias aéreas, comprometimento de visão e audição, dificuldades de aprendizagem, deformidades estéticas significativamente graves e alta pressão intracraniana (ROSCIOLI et al., 2013).



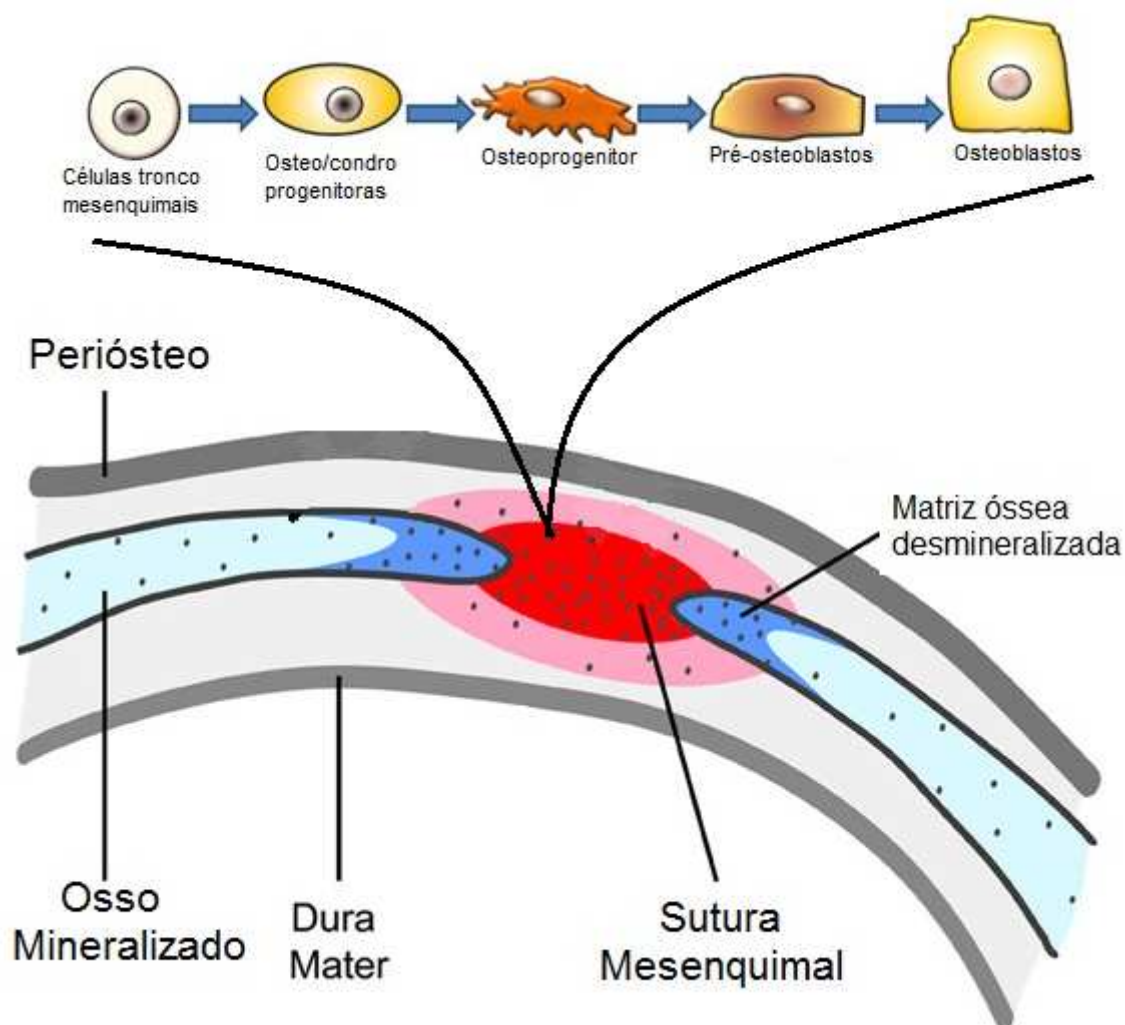


Figura1: Ilustração das diferentes células envolvidas na osteogênese na sutura. Fonte: BIOSCIENCE,2014 e PAN et al., 2013(Adaptado).

Diante de suspeita de craniossinostose deve ser realizado um exame para detectar a falta de movimento dos ossos na calvária na infância ou o sulco palpável (especialmente com sinostose sagital), além de várias radiografias do crânio. Se os achados radiográficos são anormais ou não podem ser interpretados com clareza, a cintilografia do crânio pode auxiliar na avaliação. Caso o diagnóstico definitivo não possa ser feito, um índice cefálico (largura máxima da cabeça/ comprimento máximo da cabeça X 100) deve ser calculado. O paciente também deve ser avaliado quanto à presença ou ausência de outras AC, visto que as informações mais significativas para o diagnóstico de síndromes são obtidas na avaliação de defeitos dos membros, anomalias auriculares, malformações cardiovasculares, dentre outras (COHEN, 1980; NAGAJARA, ANSLOW e WINTER, 2012).

O único tratamento disponível para indivíduos com craniossinostose é a intervenção cirúrgica (JOHNSON et al., 2003), cujo objetivo é proporcionar espaço para o crescimento do cérebro e diminuir as complicações associadas com o aumento da pressão intracranial (RENIER et al., 1996; NAGAJARA, ANSLOW e WINTER, 2012).

### ***1.1.1 Classificação das craniossinostoses***

As craniossinostoses são classificadas como simples (envolvendo uma única sutura) ou complexas (envolvendo múltiplas suturas) e também como primárias ou secundárias. As primárias são causadas por um defeito intrínseco da sutura, podem ser geneticamente determinadas e, tanto o desenvolvimento anormal do crânio quanto o fechamento das suturas, estão presentes ao nascimento. Na craniossinostose secundária o fechamento da sutura é resultante de uma desordem conhecida, como: microcefalia, doenças hematológicas (talassemias, drepanocitose), metabólicas (hipertireoidismo e Síndrome de Hurler), ósseas e malformações (COHEN JR, 1980; PASSOS-BUENO et al., 2007; LATTANZI et al., 2012).

De acordo com a sutura envolvida as craniossinostoses são classificadas em: sagital em 40-55% dos casos, coronal em 20-25%, metópica em 5-15% e lambdóide em 0-5% (COHEN JR, 1980) (Figura 2). A classificação cirúrgica é baseada na forma do crânio, e os termos descritos são: escafocefalia, trigonocefalia, plagiocefalia, oxicefalia, braquicefalia, e turricefalia, sendo cada um associado à sutura(s) específica(s) (Tabela 1) (NAGAJARA, ANSLOW e WINTER, 2012; LATTANZI et al., 2012).

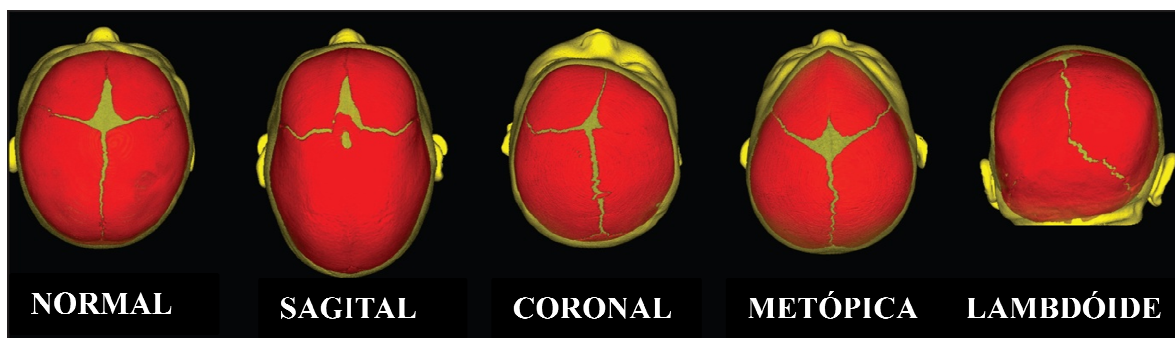


Figura 2: Representação ilustrativa dos tipos de fechamento das suturas. Fonte: PEDIATRICNEWS, 2013 (Adaptado).

Tabela 1: Relação entre classificação cirúrgica e anatômica da craniossinostose. Fonte: NAGAJARA, ANSLOW e WINTER, 2012 (adaptado)

Classificação cirurgica versus classificação anatômica da Craniossinostose	
<b>Termo usado (Cirurgico)</b>	<b>Sutura fundida (Anatomico)</b>
Escafocefalia/Dolicocefalia	Sagital
Trigonocefalia	Metópica
Plagiocefalia	Forma anormal, mas não devido a craniossinostose
Oxicefalia	Somente sinostose coronal bilateral
Braquicefalia	Sinostose coronal bilateral com envolvimento da base do crânio
Turricéfalia	Sinostose coronal e sagital

### 1.1.2 Etiologia das craniossinostoses

A etiologia exata das craniossinostoses ainda não é totalmente compreendida. No passado, Virchow (1851), Moss (1959) e Park e Powers (1920) postularam teorias para tentar explicar a causa da craniossinostose. Virchow (1851) acreditava que a craniossinostose era a malformação primária e a deformidade da base do crânio associada era secundária a craniossinostose. Moss (1959) defendia o contrário, isto é, que a malformação da base do crânio era a anomalia primária, resultando em fusão prematura das suturas cranianas secundária. Park e Powers (1920), por sua vez, afirmavam que um defeito primário no blastema de células mesenquimais resultava em craniossinostose e em uma base craniana anormal. Embora a teoria do Moss (1959) seja a mais aceita, hoje sabe-se que a craniossinostose é heterogênea, tanto em relação aos aspectos clínicos quanto às bases moleculares, podendo ser desencadeada por fatores ambientais e genéticos (mutações gênicas ou aberrações

cromossômicas) que atuam de forma isolada ou em conjunto em um contexto multifatorial (revisado em COHEN JR, 1980).

Vários fatores de risco para craniossinostose têm sido relatados: raça materna, fumo materno durante a gravidez, hipertireoidismo materno ou neonatal, idade gestacional pós-termo e idade materna avançada. Forças mecânicas anormais (pressão externa ou deficiência subjacente do crescimento cerebral) podem ser uma causa predisponente em alguns casos. Alguns estudos demonstraram relação de craniossinostose com o uso de medicamentos, tais quais difenil-hidantoina, retinóides, valproato, aminopterina, fluconazol, ciclofosfamida e para infertilidade como citrato de clomifeno, bem como a utilização de ácido fólico no 1º trimestre. Porém todos esses estudos tiveram o número amostral pequeno como limitação (REEFHUIS et al., 2003; KÄLLÉN et al., 2005; PASSOS-BUENO, FANGANIELLO e JEHEE, 2011; REEFHUIS et al., 2011). Ardalan et al., (2012) estudaram os fatores de risco associados com craniossinostose em 70 pacientes e encontraram associação positiva com educação materna e paterna, idade gestacional pós-termo, história familiar e uso de citrato de clomifeno.

Podem se apresentar de forma isolada também chamada não sindrômica, sendo a sutura sagital a mais freqüentemente afetada, ou de forma sindrômica se ocorrer em associação com diversas outras anomalias congênitas, atraso no desenvolvimento ou deficiência intelectual (COHEN JR, 1980; PASSOS-BUENO, et al., 2007; LATTANZI, et al., 2012).

As craniossinostoses não sindrômicas representam 70% de todos os casos de craniossinostose. São esporádicas na maioria dos pacientes e a história familiar é positiva em 2 a 14% dos casos, dependendo da sutura envolvida (LATTANZI, et al 2012; PASSOS-BUENO et al, 2007). Nesses casos, foram descritas mutações raras nos genes *Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2)*, *Twist homolog Drosophila 1 (TWIST1)*, *FRAS1 Related Extracellular Matrix 1 (FREM1)*, *Leucine-Rich Repeat, Immunoglobulin-Like And Transmembrane Domains 3 (LRIT3)*, *Ephrin-A4 (EFNA4)* e em alguns poucos casos em *Runt-Related Transcription Factor 2 (RUNX2)* (JOHNSON et al., 2000; WEBER et al., 2001; MERRIL et al., 2006; WILKIE et al., 2007; SETO et al., 2007; MEFFORD et al., 2010; VISSEIS et al., 2011; JUSTICE et

al., 2012; e KIM et al., 2012). Recentemente, em um estudo *genome-wide*, os genes *Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2)* e *Bardet-Biedl syndrome 9 (BBS9)* foram associados com craniossinostose sagital não síndrômica (JUSTICE et al., 2012).

Por outro lado, as craniossinostoses síndrômicas correspondem a cerca de 30% dos relatos sobre craniossinostose que está presente em 150 síndromes como anomalia maior. Podem ser monogênicas ou causadas por alterações cromossômicas. No primeiro caso, são geralmente herança autossômica dominante com alta penetrância e expressividade variável (RENIER et al., 2000; PASSOS-BUENO et al., 2007). A recorrência familiar é reportada em 22% dos casos síndrômicos. Estudos de casos familiares síndrômicos mostraram que as craniossinostoses podem ser compatíveis com herança autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao X (PASSOS-BUENO et al., 2007). Cerca de 30% são explicadas por mutações em um dos oito genes descritos: *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*; *Ephrin-B1 (EFNB1)*; *Cytochrome p450 reductase gene (POR)*; *Muscle segment homeobox homolog Drosophila 2 (MSX2)* e *Ras-related protein (RAB-23)* (WILKIE et al., 2007; PASSOS-BUENO et al., 2007; MELVILLE et al., 2010; WILKIE et al., 2010). No entanto, mutações em *Fibrillin 1 (FBN1)*, *Transforming Growth Factor, Beta Receptor 1 (TGFB1)* e *Transforming Growth Factor, Beta Receptor II (TGFB2)*, são também associadas com craniossinostose (não como característica clínica maior) mas geralmente com baixa penetrância (COHEN JR et al., 1993; COHEN JR, 2000; WILKIE et al., 2010).

#### 1.1.2.1 Alterações cromossômicas como causa de craniossinostose

As alterações cromossômicas estruturais também são importantes mecanismos causadores de craniossinostose síndrômica. Cerca de 20% dos casos são decorrentes de deleções, duplicações ou outros rearranjos observados no cariótipo (WILKIE et al., 2010; PASSOS-BUENO, FANGANIELLO e JEHEE, 2011). Todos os tipos de alterações cromossômicas já foram descritas em pacientes com craniossinostose em quase todos os cromossomos humanos, com exceção dos

cromossomos 16 e 19. Casos síndrômicos foram descritos com maior frequência com duplicação 13q e 21q34 e deleção 7p15-p21, 9p21-p24 e 11q23-q25, 22q11, bem como deleção ou duplicação em 1p36 tem sido relatadas (PASSOS-BUENO et al., 2007). Deleções parciais no braço curto do cromossomo 9 (9p24-p22, síndrome de monossomia do 9p – MIM #158170) e no braço longo do cromossomo 11 (11q23-qter, síndrome de monossomia do 11q, síndrome Jacobsen; OMIM 147791), resultam em trigonocefalia e múltiplas AC e são as alterações estruturais mais freqüentemente associadas com craniossinostose síndrômica.

Um dado interessante é que parece haver associação entre as suturas envolvidas e tipos específicos de alterações cromossômicas. A fusão da sutura metópica é a mais comum e é associada com deleções (60%) e duplicações (50%), a sutura coronal é mais prevalente entre as deleções (20%), enquanto a sinostose das suturas sagital e lambdóide parecem ser mais prevalentes entre as duplicações (40%) do que entre as deleções (20%) (PASSOS-BUENO, FANGANIELLO e JEHEE, 2011).

## **1.2 Contribuições das alterações cromossômicas estruturais para a identificação de regiões e genes candidatos para craniossinostose**

As alterações cromossômicas ocorrem em cerca de seis a cada 1.000 recém-nascidos e constituem uma das causas mais freqüentes de déficit de crescimento, deficiência intelectual e AC cardíacas, esqueléticas e craniofaciais. (LUTHARDT e KEITGES, 2001). São subdivididas em numéricas e estruturais e são decorrentes de perda ou de ganho de quantidade significativa de material genético, que pode levar a danos graves ou letais.

As alterações cromossômicas estruturais são predominantemente equilibradas (inversões, translocações recíprocas e translocações Robertsonianas) e seus portadores geralmente não apresentam sinais clínicos (LUTHARDT e KEITGES, 2001). Podem ser transmitidas por seus portadores que possuem riscos reprodutivos aumentados visto que a segregação meiótica dos cromossomos pode levar à produção de gametas com o rearranjo estrutural em estado não equilibrado, tais

como as duplicações e deleções resultando em abortos espontâneos ou progênie com atraso mental com ou sem multiplas AC (FONSECA, 2011; RODRIGUES, 2010). Por outro lado, uma alteração nova não balanceada resulta em fenótipo alterado, pois leva ao desequilíbrio potencial de muitos genes (RODRIGUES, 2010) e conseqüentemente a alterações clínicas significativas.

As deleções resultam em perda de material cromossômico a partir de um cromossomo único e podem ser terminais se resultarem de uma única quebra dentro de um braço cromossômico com perda do material distal à ruptura (Figura 3a) ou intersticiais, se envolverem duas quebras dentro de um mesmo braço cromossômico com perda do material entre as quebras (Figura 3b). As conseqüências clínicas em geral refletem a haploinsuficiência (a incapacidade de uma única cópia do material genético efetuar as funções normalmente desempenhadas pelas duas cópias) e, quando examinadas, parecem depender do tamanho do segmento deletado, bem como do número e das funções dos genes existentes na região (NUSSBAUM, MCLNNES, e WILLARD, 2002).

As duplicações ocorrem quando se tem duas cópias de um mesmo segmento cromossômico e em geral são menos prejudiciais do que as deleções, mas elas também estão associadas a algumas alterações clínicas. A gravidade clínica é correlacionada com o tamanho do segmento duplicado e o efeito de dosagem do aumento da expressão dos genes duplicados (NUSSBAUM, MCLNNES, e WILLARD, 2002; LUTHARDT e KEITGES, 2001) (Figura 3c).

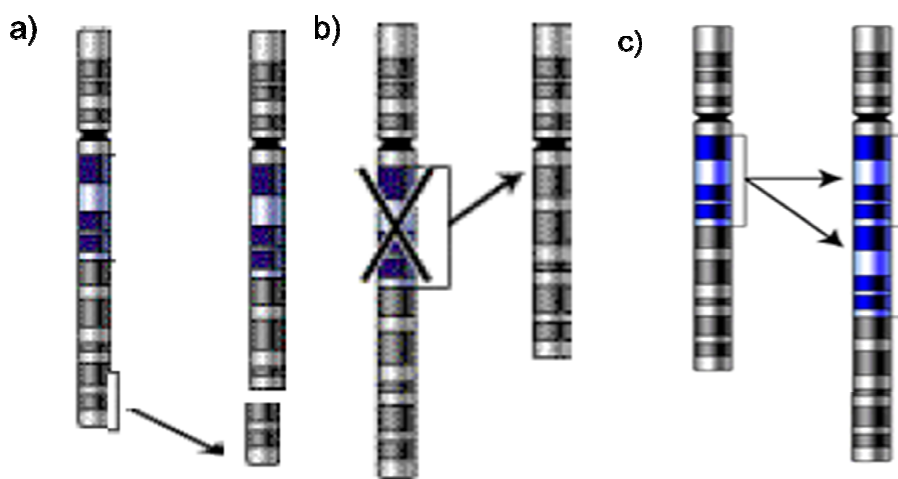


Figura 3: Ilustrações de uma duplicação e dos tipos de deleções. (a) deleção terminal, (b) deleção intersticial e c) duplicação. Fonte: RODRIGUES, 2010

A disponibilidade de técnicas moleculares para rastreio de todo o genoma em alta resolução permitiu, na última década, revelar uma quantidade inesperada de alterações estruturais, bem como a redefinição do seu conceito, principalmente em relação ao tamanho do segmento envolvido e sua importância. Essas alterações estruturais são definidas como alterações genômicas que envolvem segmentos de DNA maiores que 1 kb, microscópicas ou submicroscópicas e compreendem, dentre outras, as inversões, translocações, deleções, duplicações e variações do número de cópias (*copy number variation*, CNV). Todas as alterações estruturais, exceto as inversões e translocações, resultam em CNVs ou no desvio do número de cópias normais do segmento genômico. Essas CNVs são definidas como um segmento de DNA que está presente em número variável em diferentes genomas e cujo tamanho varia de 1kb ou mais. Quando ocorrem em mais de 1% da população, são chamadas de polimorfismo do número de cópias (FEUK, CARSON e SCHERER, 2006). A literatura descreve as CNVs como variações presentes na população em geral (documentadas no DGV) e como patogênicas (documentadas no DECIPHER). Entretanto, classificar as CNVs como patogênicas ou benignas é muito complexo e muda constantemente de acordo com os novos achados na literatura.

O impacto fenotípico mais óbvio das CNVs é a alteração no número de cópias de genes cujas funções são sensíveis a dosagem gênica. Contudo, sequências promotoras ou supressoras, miRNAs, etc., podem influir na expressão gênica. Ademais, uma CNV pode não ser suficiente para causar um fenótipo, mas predispor ou contribuir para manifestações clínicas.

Em uma revisão, Passos-bueno, Fanganiello e Jehee (2011) citam diversos exemplos de como as alterações estruturais contribuem significativamente para a identificação de genes candidatos para craniossinostose, isto é, como rearranjos cromossômicos auxiliaram na identificação do principal gene causador.

Os autores relatam que um exemplo bem sucedido é o da Síndrome de Saethre Chotzen, a qual foi mapeada na região 7p21 por meio de uma combinação de resultados de estudos de ligação e de análise de rearranjos cromossômicos que



identificaram o gene *TWIST1*, como responsável pela síndrome. Posteriormente, esses achados foram confirmados por outros diversos relatos de mutação no gene *TWIST1* associado a esta síndrome.

Outro exemplo foram os estudos com base em pacientes com diferentes deleções, duplicações e/ou triplicações em 1p36, pesquisadores conseguiram limitar essa região candidata a possuir genes responsáveis pelo desenvolvimento das suturas, sugerindo que a haploinsuficiência ou superexpressão dos genes *matrix metalloproteinase 23A e 23B (MMP23A/MMP23B)* são causa de desenvolvimento tardio das suturas ou de craniossinostose, respectivamente. Outro estudo com dois pacientes síndrômicos com fechamento prematuro das suturas sagital, metópica e lambdóide e 1 paciente com trigonocefalia sugeriram os genes *fibroblast growth factor 3 e 4 (FGF3/FGF4)*, mapeados na região 11q11-q12, como candidatos ao fenótipo.

A clonagem dos pontos de quebra de um menino com uma translocação de novo balanceada t(9;11)(q33;p15) sugeriram os genes *sex determining region Y-box 6 (SOX6)* (11p15), *toll-like receptor 4 (TLR4)* e *calcitonin-related polypeptide alpha (CALCA)* (9q33) como candidatos.

A síndrome C (trigonocefalia Opitz) foi observada em uma criança com translocação balanceada t(3;18)(q13.13;q12.1) que levou a quebra do gene *CD96 molecule (TACTILE)*. Ademais, a superexpressão de *MSX2* pode explicar a alta frequência de craniossinostose encontrada em pacientes com trissomia do 5q.

### **1.3 Métodos de análise de alterações estruturais como estratégia para identificação de genes candidatos**

O mapeamento dos genes constitui uma etapa importante na compreensão da biologia de uma doença genética. É frequentemente realizado por meio de duas estratégias principais: correlações entre alterações cromossômicas associadas a

fenótipos anormais e estudos de ligação em grandes famílias apresentando vários indivíduos afetados. Na primeira estratégia, foco dessa dissertação, a presença de alterações estruturais, microscópica ou submicroscópicas, associadas a fenótipos anormais sugere que os pontos de quebra, a monossomia ou a duplicação de segmentos possam estar interferindo na expressão de um ou mais genes, o que explicaria a doença observada. A identificação precisa da alteração é possível com uso de técnicas citogenéticas e moleculares que permitem, com auxílio da análise em bancos de dados, refinar a localização do rearranjo e deduzir quais são os genes provavelmente envolvidos (UEHARA, 2010).

Nos anos 70, foram desenvolvidos protocolos de coloração que produziam um padrão reprodutível de bandas claras e escuras ao longo dos cromossomos, permitindo a identificação de todos os pares de cromossomos, e assim, alterações estruturais passaram a ser identificadas com maior precisão em uma resolução de ~10Mb em preparações metafásicas ou de ~5Mb nas prometáfásicas (cariótipo de alta resolução). Contudo, mesmo o cariótipo sendo de alta resolução, muitas síndromes de alterações cromossômicas submicroscópicas não podem ser detectadas (EDELMANN e HIRSCHHORN, 2009; FONSECA, 2011).

Uma proporção importante de desordens do desenvolvimento neurológico (deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento), abortos espontâneos no 1º trimestre, múltiplas AC, incluindo craniossinostose síndrômica, resultam de alterações estruturais submicroscópicas. Embora algumas dessas sejam citogeneticamente visíveis, muitas pesquisas têm demonstrado que análises genéticas com enfoque molecular são mais apropriadas para detectar as microdeleções e duplicações muito pequenas (RAUCH et al., 2006; JEHEE et al., 2008; EDELMANN e HIRSCHHORN, 2009; TZETIS et al., 2012; VELTMAN et al., 2012; GAO et al., 2012; IOUROV et al., 2012; LEE et al., 2012; IZZO et al., 2013).

Em 1990, foram desenvolvidas técnicas citogenéticas com abordagem molecular, o que representou um grande avanço na capacidade de detectar síndromes conhecidas e também de identificar rearranjos cromossômicos de origem desconhecida. A Hibridização *in situ* Fluorescente (*Fluorescence in situ hybridization* - FISH), consiste no anelamento de sondas de DNA marcadas com fluoróforo locus-

específico para as seqüência complementares do genoma e auxilia na identificação de rearranjos cromossômicos estruturais e na melhor definição de pontos de quebra. Sua resolução em preparações metafásicas/prometafásicas é de 100 kb a 5 Mb, em núcleos interfásicos é de 50 kb a 2 Mb e em fibras de cromatina 1 kb a 500 kb (EDELMANN e HIRSCHHORN, 2009; RODRIGUES, 2010; FONSECA, 2011). Devido à necessidade da confecção de sondas específicas, a técnica de FISH é mais utilizada na detecção de alterações cromossômicas já conhecidas. Por isso, não é apropriada em casos em que a condição clínica não se encontra bem esclarecida quanto a sua origem genética e/ou existem muitas dúvidas no diagnóstico clínico (CHO et al., 2009). Vários outros métodos baseados em FISH têm sido úteis na identificação de algumas dessas alterações (EDELMANN e HIRSCHHORN, 2009).

Em síntese, mesmo que técnicas baseadas em FISH detectem a maioria das alterações cromossômicas, elas utilizam sondas que tem somente alguns cromossomos ou loci específicos como alvos, assim, perdem informações sobre as regiões proximais ou distais às flanqueadas pelas sondas (GAO et al., 2012). Outras desvantagens são a necessidade de grande quantidade de material genético, não detectar algumas deleções atípicas, não fornecer informações sobre o comprimento total da deleção e principalmente não permitir a realização de reações *multiplex*.

Um método alternativo para análise molecular, desenvolvido em 2002 por Schouten et al., é a técnica Amplificação de Múltiplas Sondas Dependentes de Ligação (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA), a qual permite uma análise rápida, simples e de baixo custo de alterações do número de cópias de até 50 seqüências específicas de DNA em regiões genômicas de interesse. Requer amostras pequenas de DNA (~20 ng), fornece resultados rápidos e pode ser utilizado pra detectar desequilíbrios subteloméricos e microdeleções específicas importantes em vários fenótipos.

A principal característica do MLPA é que as seqüências alvo não são amplificadas, mas sim as sondas que hibridizam com a seqüência alvo. Em contraste com um padrão de PCR *multiplex*, um único par de iniciadores de PCR é utilizado para a amplificação. As duas sondas de oligonucleotídeos hibridizam na seqüência alvo

imediatamente próxima e então as suas seqüências alvo podem ser ligadas durante a reação de ligação. Isso por que somente as sondas ligadas serão amplificadas espontaneamente durante a reação de PCR. Os produtos amplificados variam entre 130 e 480 nt e são separados utilizando eletroforese capilar. Sondas de oligonucleotídeos que não foram ligadas somente contêm uma seqüência de primer. Como consequência, eles não podem ser amplificados espontaneamente e não geram um sinal. A remoção das sondas não ligadas é desnecessária no MLPA, e faz com que esse método seja de fácil de execução. No entanto, possui a desvantagem, que o resultado negativo não exclui totalmente a possibilidade de o indivíduo possuir alguma das síndromes pesquisadas, pois a alteração pode se encontrar em regiões não flanqueadas pelas sondas utilizadas ou a síndrome pode ter sido causada por outro mecanismo que não microdeleção/duplicação (SABBAG, 2012), além de não permitir a detecção de rearranjos balanceados e não detectar casos de mosaicismo com menos de 40% das células alteradas (KOZLOWSKIET et al., 2008).

A técnica de *Comparative Genomic Hybridization* (CGH) foi descrita uma década antes do surgimento do MLPA (KALLIONIEMI et al., 1992) e era aplicada, sobretudo, na análise citogenética de tumores sólidos. Na CGH, é utilizado o DNA ao invés de metáfases do material testado, superando uma das principais limitações que é a obtenção de metáfases para análise. O DNA da amostra (teste) e um DNA controle normal (referência) são diferencialmente marcados e co-hibridados com cromossomos metafásicos de indivíduos normais. As intensidades de hibridação dos genomas teste e de referência são representadas em imagem digital e quantificadas. Por meio da comparação de intensidades dos dois DNA nas diferentes regiões cromossômicas, a CGH possibilita detectar alterações no número de cópias do DNA teste, ou seja, ganho ou perda de segmentos cromossômicos, mas apresenta duas importantes limitações: não detecta rearranjos equilibrados e detecta apenas deleções de tamanho  $\geq 5$  Mb e  $\geq 2$  Mb para as duplicações (CATELANI, 2010; EDELMANN e HIRSCHHORN, 2009).

Assim, a necessidade de se analisar todo o genoma em uma resolução que superasse as tecnologias já existentes levou a implementação da CGH em microarranjos de DNA (*Array Comparative Genomic Hybridization* – aCGH) (EDELMANN e HIRSCHHORN, 2009), uma tecnologia de alta-resolução, inovadora,

também chamada de cariótipo molecular, que permite uma investigação específica de variações sutis no número de cópias de segmentos genômicos (como microdeleções e microduplicações) e uma definição do tamanho do segmento cromossômico envolvido (ROCHA, 2013). Essa técnica utiliza como alvo de hibridização, no lugar dos cromossomos metafásicos utilizados para CGH, um conjunto de sondas organizadas em alta densidade em uma lâmina de vidro.

O DNA controle e o DNA teste, marcados com fluorocromos diferentes, competem pela hibridação nas sondas fixadas e organizadas na superfície da lâmina; perdas e ganhos de segmentos são indicadas pela diferença na intensidade da fluorescência dos fluorocromos. Inicialmente, as sondas-alvo do *array* utilizavam segmentos de DNA conhecidos e clonados em *BACs* (cromossomos artificiais de bactérias) (75-200kb), ou menores inseridos em cosmídeos (30-40kb), fasmídeos (40-50kb) ou plasmídeos (2-6kb). Os primeiros *arrays* foram construídos em plataformas de cosmídeos, e depois foram substituídos por *BAC's*, as quais possuíam grande sensibilidade e os resultados podiam ser facilmente validados por FISH. Os fragmentos clonados de DNA que inicialmente substituíram os cromossomos metafásicos têm localização conhecida nos cromossomos e podem ser diretamente relacionados à sequência do genoma humano. Porém, a produção de DNA de *BACs* é extremamente trabalhosa e a resolução é limitada pela distância genômica entre os clones e o tamanho dos fragmentos de DNA clonados (em geral 100-200 kb). Plataformas mais recentes têm como alvos de hibridação os oligonucleotídeos. Esses *oligoarrays* permitem maior flexibilidade na confecção de sondas, maior cobertura genômica e resolução superior aos *arrays* de BAC (SABBAG, 2012; FONSECA, 2011). A plataforma de aCGH de oligos, utiliza um conjunto de oligonucleotídeos sintéticos fixados sobre uma placa, onde são hibridizados os DNAs previamente marcados com os corantes Cy3-dCTP para a amostra teste e Cy5-dCTP para a amostra controle. O nível de resolução das diferentes plataformas de aCGH depende da distância (1-100 Mb) e do tamanho (25 nt – 200 Kb) das sondas de DNA utilizadas, sendo possível detectar alterações consideradas submicroscópicas, isto é, menores que 5 Mb (ROCHA, 2013) (Figura 4).

A técnica de aCGH é capaz de detectar perdas e ganhos cromossômicos com maior resolução, e diferentemente da análise citogenética convencional e da técnica de

FISH, dispensando a cultura celular para a obtenção de preparações metafásicas do indivíduo a ser examinado, utilizando, para tanto, o seu DNA. Além disso, não há desvio para a análise de regiões cromossômicas específicas, uma vez que todo o genoma é analisado. Sendo assim, não requer conhecimento prévio da origem da alteração. Dentre outras vantagens, está a rapidez de finalização do experimento, a praticidade e a sensibilidade, auxiliando na identificação de diversas síndromes novas. Por outro lado, há também desvantagens quando comparada com técnicas citogenéticas, como a não detecção de translocações balanceadas, inversões, ou alterações fora das sondas e dissomia uniparental, além do custo alto, não condizente com a infraestrutura de muitos locais, o que pode inviabilizar a sua aplicação nos países em desenvolvimento. A técnica tem menor sensibilidade para triploidias e baixa taxa de detecção de mosaicismos, comumente associado com mortalidade pós-natal e doenças cerebrais. Contudo, várias dessas estão sendo superadas nos *arrays* de SNP (STANKIEWICZ e BEAUDET, 2007; GAO et al., 2009; IOUROV et al., 2012; LEE et al., 2012).

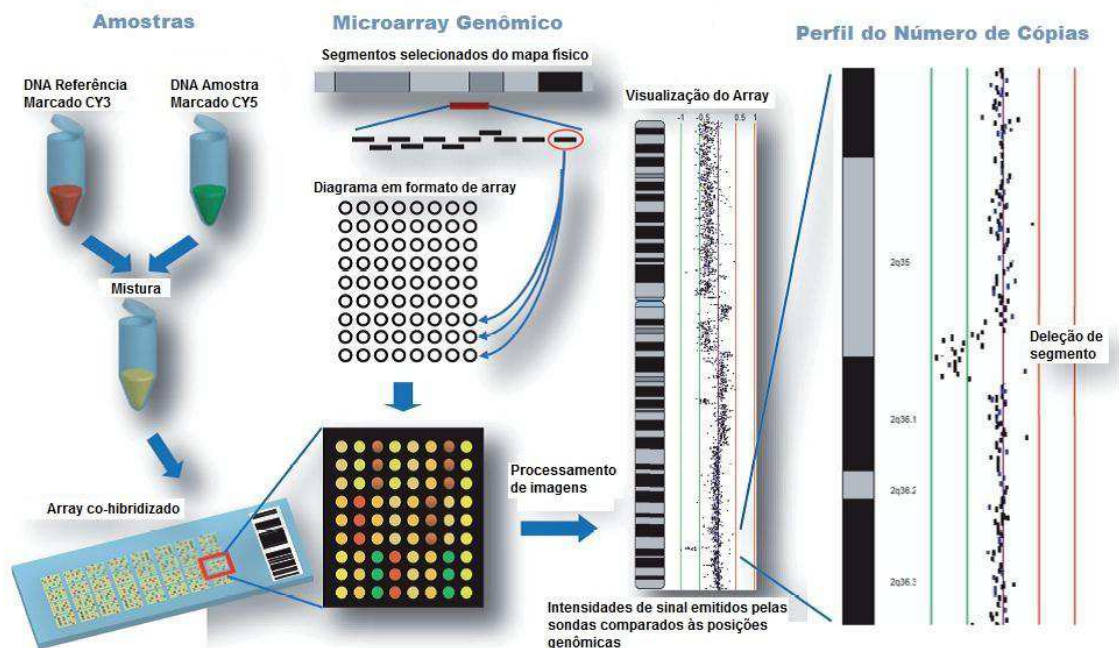


Figura 4 - Técnica de Hibridização Genômica Comparativa em Array (CGH-array).  
Fonte: Adaptado de CHARI, LOCKWOOD e LAM, 2007.

Em vários casos, as alterações detectadas por aCGH levaram à identificação de genes responsáveis por síndromes, como nos casos das síndromes de Charge (VISSERS et al., 2004) e de Peter Plus (LENISK OBERSTEIN et al., 2006). Com base no fato que as microdeleções e microduplicações compreendem mais de 15%

de todas as mutações causadoras de doenças genéticas, a verificação do seu impacto nas craniossinostoses é de extrema importância. Até hoje, somente Jehee et al., (2008), Wilkie et al., (2010) e Mefford et al., (2010) estudaram a presença de alterações submicroscópicas/CNVs em pacientes com craniossinostose.

A técnica de aCGH é eficiente para identificar regiões, alterações genômicas ou variações no número de cópias de DNA e caracterizar os pontos de quebra diretamente relacionados a fenótipos clínicos específicos. A avaliação clínica combinada com análises em alta resolução das alterações estruturais pode contribuir a descoberta de novos genes potencialmente associados à craniossinostose, além de proporcionar novas perspectivas no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no fechamento das suturas, no diagnóstico e aconselhamento genético.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar novos genes e regiões cromossômicas relacionados com craniossinostose associada a outros sinais clínicos com etiologia desconhecida.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de microdeleção e microduplicação nos pacientes;
- Com base nos dados da literatura e em bancos de dados genômicos sobre indivíduos controle (*Database of Genomic Variant, DGV*) e afetados (*Databases of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans usando as ferramentas do Ensembl, DECIPHER*), avaliar a relevância das alterações encontradas para o quadro clínico dos pacientes de forma a estabelecer possível correlação entre o fenótipo dos indivíduos e as regiões cromossômicas alteradas e determinar entre os genes contidos nessas regiões, os genes candidatos a causar craniossinostose.



### **3 PACIENTES E MÉTODOS**

Essa pesquisa foi realizada no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Pesquisa Isabel Cristina Andreatta Lemos Paulo da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia (EMESCAM) e no Laboratório de Genética do desenvolvimento, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP).

#### **3.1 Casuística**

A amostra foi constituída por cinco pacientes que apresentaram craniossinostose associada a outras anomalias, porém sem critérios para as síndromes já descritas. A paciente 1 foi atendida durante o projeto “Caracterização Clínica e Epidemiológica das Anomalias Congênitas nas Maternidades de Dois Hospitais-Escolas do Município de Vitória – ES”, aprovado pela Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-EMESCAM: 148/2010) e realizado no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV) e Hospital das Clínicas Antônio de Moraes (HUCAM). As informações clínicas dessa paciente estão mais detalhadas, pois ela foi avaliada três vezes, nas idades de 29 dias, 13 meses e 2,2 anos. Os outros quatro foram atendidos no Serviço de Aconselhamento Genético do Centro de Estudos do Genoma Humano, CEGH (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da USP), e faziam parte do estudo “Diretrizes para o Biobanco do Centro de Estudos do Genoma Humano”, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos – do Instituto de Biociências da USP (Protocolo nº 121/2011). Os responsáveis pelos pacientes, após os devidos esclarecimentos, deram consentimento através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para que o exame fosse utilizado em pesquisa e divulgação científica.

### **3.2 Avaliação clínico-genética dos indivíduos**

A paciente 1 foi avaliada 24h após seu nascimento por médicos neonatologistas e pediatras previamente treinados de plantão no Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV), seguindo o Protocolo proposto por Merks et al., (2003). Esse Protocolo foi utilizado com o objetivo de uniformizar a classificação dos achados clínicos aparentemente anormais, por uma nomenclatura dos erros de morfogênese detectáveis no exame de superfície. Como padronizado no projeto, caso o paciente apresentasse uma AC maior e/ou três ou mais AC menores seria encaminhado para exames citogenéticos e moleculares e acompanhamento com um geneticista.

Os pacientes 2, 3, 4 e 5 foram encaminhados de diversos serviços e avaliados por profissionais do Serviço de Aconselhamento Genético do CEGH (IB-USP). Essa avaliação seguiu a rotina desse serviço, constando de anamnese específica com coleta de dados gestacionais, de antecedentes pessoais e de evolução; levantamento da história familiar e exame físico. Após avaliação clínica foi solicitado, quando pertinente, outros exames complementares.

### **3.3 Coleta de sangue, extração e quantificação do DNA**

A coleta, extração e quantificação do DNA da paciente 1 foi realizada no Laboratório de Genética Humana e Molecular do Centro de Pesquisa da EMESCAM. Nos demais pacientes, essa etapa foi realizada no Laboratório de Genética do Desenvolvimento Humano, IB-USP.

Cerca de 2 ml de sangue periférico, coletado por venopunção em tubo com Heparina Sódica, foi destinado à cultura temporária de linfócitos para obtenção de células metafásicas para estudo citogenético, e outro com EDTA destinado à extração de DNA e posterior análise molecular. O DNA dos pacientes e de seus pais foi extraído

usando o kit Gentra Puregene (Qiagen-Sciences, Maryland, USA). A concentração e pureza do DNA foram analisadas pelo NanoDrop 2000 UV-vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Mass., USA).

### **3.4 Citogenética clássica**

Para identificar alterações cromossômicas numéricas e estruturais  $> \sim 5\text{Mb}$ , o cariótipo da paciente 1 e de seus pais foi estudado por coloração de Giemsa e bandeamento (GTG) em laboratório privado. Lâminas de metáfase foram preparadas a partir de cultura de linfócitos de sangue periférico de acordo com procedimento padronizado (Moorhead et al., 1960 modificado).

O pacientes 2, 3, 4 e 5 foram encaminhados diretamente para análise molecular, por isso não foi realizado cariótipo.

### **3.5 Análises moleculares**

De acordo com o protocolo padrão estabelecido no projeto “Caracterização Clínica e Epidemiológica das Anomalias Congênitas nas Maternidades de Dois Hospitais-Escolas do Município de Vitória – ES”, o DNA da paciente 1 e de seus pais foram encaminhados para realizar MLPA. O DNA dos pais dos pacientes 4 e 5 também foram estudados por MLPA. O DNA dos demais pais não possuíam qualidade suficiente para realização desse estudo. Essa etapa foi realizada no CEGH (IB-USP).

### **3.5.1 MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*)**

A técnica de MLPA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante utilizando kits para regiões subteloméricas de todos os cromossomos (P036-E1 e P070-B2 - MRC-Holland®, Amsterdam, Netherlands) e análise de regiões cromossômicas envolvidas com as síndromes de microdeleção: Síndrome da deleção 1p – região 1p36-1pter; Síndrome de Williams – região 7q11.2; Síndrome de Smith-Magenis – região 17p11.2; Síndrome de Miller-Dieker – região 17p13.3; Síndrome de Prader-Willi/Síndrome de Angelman – região 15q11.2; Síndrome de Alagille – região 20p12.2, gene *Jagged 1* (*JAG1*); Síndrome de DiGeorge (Velocardiofacial) – região 22q11.21; Síndrome de Saethre-Chotzen – região 7p21, gene *TWIST1*; Síndrome de Sotos – região 5q35.3, gene *Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1* (*NSD1*) (kit P064-B2 - MRC-Holland®, Amsterdam, Netherlands).

Inicialmente, os produtos de PCR foram separados por eletroforese capilar utilizando o Mega-BACE 1000 e a análise dos fragmentos foram realizados utilizando o software Mega-BACE *Fragment Profiler software* version 1.2 (ambos GE *Healthcare Life Sciences*). Análises estatísticas foram realizadas utilizando planilhas do Excel desenvolvidas pelo *National Genetics Reference Laboratories* (NGRL, Manchester, UK, [www.ngrl.org.uk](http://www.ngrl.org.uk)). Os detalhes das regiões detectadas por cada kit podem ser encontrados em [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com). Todas as sondas foram desenhadas seguindo o protocolo do MRC-Holland e as seqüências estão fornecidas na Tabela S3 (<http://www.mlpa.com/index.htm>).

### **3.5.2 Comparative Genomic Hybridization array (aCGH)**

A fim de investigar a presença de desequilíbrios genômicos submicroscópicos e delimitar o tamanho dessas alterações com um nível de resolução maior, as amostras de DNA foram estudadas por aCGH, realizada no CEGH. A plataforma de aCGH utilizada foi CytoSure™ ISCA array 4X180k (Oxford Gene Technology, OGT,

UK). Esses oligoarrays contêm quatro áreas com aproximadamente 180.000 oligonucleotídeos de 60pb. Os procedimentos de purificação das amostras, hibridização e lavagem foram realizados conforme descrito pelo fabricante.

Na primeira etapa, foi realizada a marcação do DNA teste e DNA controle com fluoróforos (*CytoSure Genomic DNA labelling kit*, OGT, UK). As amostras de DNA genômico teste e referência de sexos opostos (com 18 ul cada) foram misturadas com 10 ul de “*random primer*” e 10 ul de “*reaction buffer*” e desnaturadas por um termociclador em 99° C por 20 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram colocadas no gelo por 5 minutos e centrifugadas por 15 segundos. Ainda no gelo, foi adicionado em cada tubo 10 ul de “*mix dCTP*” e 1 ul de fragmento “*Klenow*”. Além disso, na amostra de estudo foi adicionado 1 ul de fluoróforo Cy3-dCTP e na amostra de referência 1 ul de fluoróforo Cy5-dCTP. Ambos tubos foram agitados manualmente e centrifugados por 10 segundos. Em seguida, incubados a 37° C por 4 horas e 65° C por 10 minutos.

A segunda etapa foi a de purificação utilizando “*Cleanup columns*” (OGT, UK). Duas colunas foram vortexadas e encaixadas em um tubo coletor, centrifugadas por 1 minuto em 2.000 x g, e após o eluente foi descartado e as colunas foram colocadas em tudo coletores limpos. Em seguida, as amostras foram colocadas no centro da resina da coluna e centrifugadas por 1 minutos em 2,000 x g. A qualidade e pureza das amostras foi avaliada usando *NanoDrop*.

A etapa seguinte foi de preparação do DNA marcado para hibridização, utilizando o Kit de hibridização *Agilent Oligo aCGH*). Nesta etapa, foi preparada uma solução de hibridização com 2ul de Cot 1 (1,0 ml/mL), 4,5 ul de Agilent 10x *Blocking Agent*, 22,5 ul de tampão de hibridização e 2 x Hi-RPM. Um volume de 28,5 ul foi adicionado em todos os tubos contendo o DNA marcado. Após a mistura por pipetagem, as amostras foram levadas ao termociclador por três minutos a 95° C e 30 minutos a 37°C.

Na etapa de hibridização, 40 ul do mix de hibridização misturado ao DNA foi depositado nos poços da lamínula, que foi unida virada para baixo a uma lâmina de

hibridização e envolvida por uma câmara. Esta câmara foi colocada em prateleira rotatória em forno de hibridização a 65° C, 10 rpm, por 22 horas.

Na etapa seguinte, foram realizadas pós-lavagens. Inicialmente, a lâmina e lamínula foram separadas manualmente e mergulhadas em tampão de lavagem 1 em temperatura ambiente por 5 minutos, com agitação mecânica. A segunda lavagem foi feita com o tampão 2, a 37° C com agitação magnética por 1 minuto. Em seguida as lâminas foram lavadas em acetonitrila, também em agitação mecânica, por 10 segundos. As lâminas foram então mergulhadas em solução de estabilização e secagem, com a mesma agitação por 30 segundos. Após as lavagens, as lâminas foram imediatamente posicionadas no suporte SureScan para serem escaneadas em seguida. Para o escaneamento das lâminas de *microarray*, utilizamos o Agilent *SureScan C scanner*. Os dados foram processados com o *Feature Extraction software* e subsequente analisados com *Genomic Workbench software/GenePix feature extraction software* e interpretados pelo *CytoSure Interpret software*.

#### 3.5.2.1 Análise dos dados

A análise dos dados obtidos pela aCGH foi realizada por meio de pesquisa nos bancos de dados: *Genome Bioinformatics Group* of UC Santa Cruz (UCSC *Gene Browser*) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI *Map Viewer*), para identificar os genes presentes nas regiões alteradas, e no DECIPHER a fim de avaliar a relevância dos genes em relação ao fenótipo. Somente foram analisados genes *Reference Sequence (RefSeq)* e presentes no *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM). Casos com deleção/duplicação menores que 3 Mb foram também analisados no DGV. O banco de dados NCBI cuja última atualização de seqüenciamento de referência do genoma humano foi em novembro de 2013, utiliza a plataforma *Human Annotation Release 105* que inclui a montagem GRCh37 e também tem disponível a plataforma anterior Build 36.3, assim como o UCSC. Entretanto, algumas informações contidas em cada um deles nem sempre são

equivalentes. As plataformas comparativas do genoma humano utilizadas no presente estudo foram Build36/hg18 para os pacientes 1, 4 e 5 GRCh37/hg19 para os pacientes 2 e 3.

Ainda não existem critérios definitivos para discriminar se uma CNV em um afetado é responsável pelo seu fenótipo, os parâmetros de avaliação são relativamente consensuais, os quais foram avaliados no *American College of Medical Genetics Standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants* (KEARNEY et al., 2011). O fenótipo de craniossinostose foi relacionado as CNVs e aos genes afetados com base nos critérios sumarizados por Lee et al., (2007) (Tabela 2).

Tabela 2 - Fatores que influenciam o efeito fenotípico de CNV. Fonte: LEE et al., 2007.

Critérios maiores	Características das CNVs	
	Patológica	Benigna
1 a. CNV é herdada de um genitor normal		X
b. CNV é herdada de um genitor afetado	X	
2 a. CNV é similar à de um indivíduo normal		X
b. CNV é similar à de um indivíduo afetado	X	
3 a. CNV se sobrepõe a um rearranjo genômico em um banco de dados de indivíduos normais (DGV, por exemplo)		X
b. CNV se sobrepõe a um rearranjo genômico em um banco de dados de indivíduos afetados (DECIPHER, por exemplo)	X	
4 CNV contém genes classificados como mórbidos pelo OMIM	X	
5 a. CNV é rica em genes	X	
b. CNV é pobre em genes		X
Critérios menores	Características das CNVs	
	Patológica	Benigna
1 a. CNV é uma deleção	X	
b. CNV é uma deleção em homozigose	X	
2 a. CNV é uma duplicação		X
b. CNV é uma amplificação (ganho maior que uma cópia)	X	
3 CNV é > 3Mb		X
4 CNV esta livre de elementos de regulação conhecidos		X

## 4 RESULTADOS

Foram estudados quatro meninos e uma menina com idade variando de um dia a nove anos, sendo dois com escafocefalia, dois com trigonocefalia e um com ambas as formas de cranioossinostose. O aCGH detectou alterações em todos os pacientes, sendo quatro deleções e 1 duplicação que variaram de 0,4 Mb a 12,9 Mb. Os resultados serão apresentados separadamente por paciente e em um resumo com as informações de todos os pacientes no Apêndice I.

### 4.1 Paciente 1

#### ***4.1.1 Dados gestacionais, antecedentes e evolução***

E.V.B.N, é a 2º filha de pais não consangüíneos. A mãe (38 anos) apresenta arritmia cardíaca, relatou um aborto espontâneo (G3P2AB1), o pai (41 anos) sem queixas e o irmão mais velho apresenta epilepsia em tratamento. Negam histórico familiar de retardo mental, atraso no desenvolvimento ou malformações congênitas. Antes da gestação a mãe fez uso de Ácido Fólico e há 7 anos utiliza medicamento antiarrítmico (Propanolol®). Gravidez e parto transcorreram sem intercorrências. A paciente nasceu a termo (39,2 semanas) de cesária pélvica pesando 3,405 kg (pct<2º), com 45 cm de comprimento (pct<3º), 36,5 cm de perímetro cefálico (PC) (pct normal), APGAR 8 no 1º minuto.

#### ***4.1.2 Exames físicos***

Foram observadas as anomalias menores escafocefalia, assimetria facial, fronte curta e com estreitamento bitemporal, proptose ocular, ânus anteriorizado e diástase de reto abdominal, e microtia como anomalia maior (Figura 5a). Tomografia



computadorizada 3D confirmou a escafocefalia (Figura 7). Na 2ª avaliação (29 dias de idade), ela apresentou 48 cm de altura (pct<3º), 3,350 kg de peso (3º pct) e 36 cm de PC (pct normal). Foi observado: hipotonia, microcefalia, estrabismo, nariz pequeno, microretrognatia, lábio superior fino, pescoço curto (Figura 5c, 5d e 5e), clinodactilia do 4º e 5º dedos, prega palmar única transversa e unhas hipoplásicas (Figura 6a e 6b). Com 13 meses, na 3ª avaliação, pesava 5,4 kg (pct <3º), com 66 cm de altura (pct<3º) e 41,2 cm de PC (3º pct). Se alimentava normalmente. Sentou sem apoio com 1 ano e 7 meses. Realizou cirurgia para abertura da sutura sagital (Figura 6b). Aos 2 anos pesava 8 kg (pct<3º), media 74 cm de altura (pct<3º) e 43,7 cm de PC (pct<3º), andava com apoio de andador, não falava nenhuma palavra, apenas emitia sons. Seu comportamento é afetuoso e nunca sofreu nenhum episódio de convulsão.



Figura 5: Fotos da paciente 1 com a) 1 mês; b) após cirurgia corretiva da escafocefalia; e com 2,2 anos c) perfil. Note a microtia; d) frontal. Note o estrabismo, microtia e lábio superior fino; e) sentada. Note a posição de flexão dos joelhos. Fonte: arquivo do projeto “Caracterização Clínica e Epidemiológica das Anomalias Congênitas nas Maternidades de Dois Hospitais-Escolas do Município de Vitória – ES”

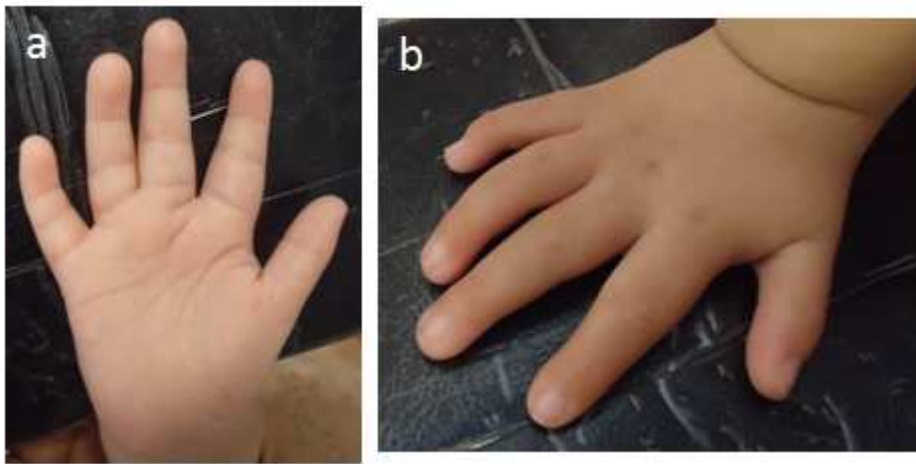


Figura 6: Fotos da mão da paciente 1. Note clinodactilia do 4º e 5º dedos e sindactilia do 3º e 4º.



Figura 7: Tomografia computadorizada 3D do crânio da paciente 1.

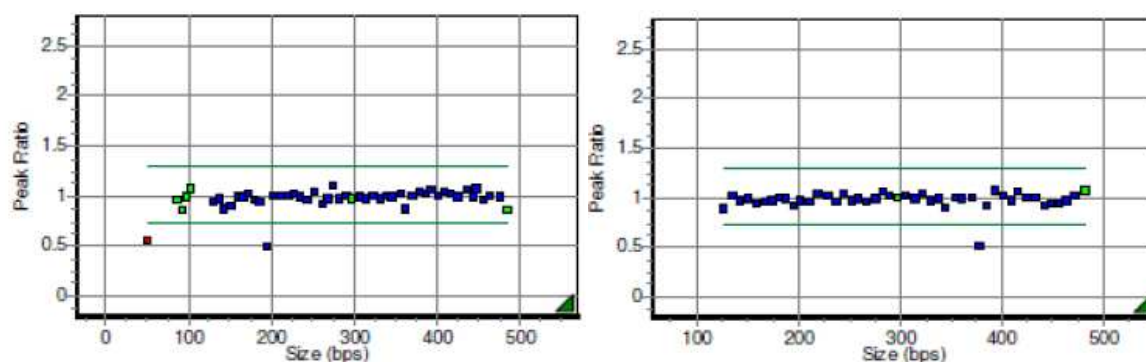
#### 4.1.3 Exames complementares

A paciente realizou exames complementares e ao ecocardiograma foi diagnosticada com Persistência do Canal Arterial (PCA) e Comunicação Intra Ventricular (CIV). A ressonância nuclear magnética cranioencefálica confirmou a escafocefalia. A audiometria demonstrou um limiar eletrofisiológico em 70dB em ambos ouvidos. O resultado da imitanciometria foi timpanograma de ambos os ouvidos tipo B. As emissões otoacústicas evocadas por transiente (EOAT) teve resultado alterado nas bandas frequenciais 0.8K, 1.6K, 2.4K, 3.2K e 3.6kHz bilateral. Exames oftalmológicos, ultrassonografia e ecografia abdominais e RX da coluna dorso-lombar sem alterações.

O cariótipo (GTG) da paciente é 46,XX. O MLPA revelou uma deleção subtelomérica no braço longo do cromossomo 10 na região q26.2-q2. O cariótipo e o MLPA dos pais apresentam resultado sem alterações (Figura 8a e 8b) e por esta razão não foi realizado aCGH no DNA dos pais.

O estudo por aCGH revelou uma deleção no braço longo do cromossomo 10 em 10q26.12-q26.3 (10:122.085.501-135.053.489; build36/hg18) com 12,967,989 bp (Figura 9) abrangendo 68 genes *RefSeq* e 41 presentes no OMIM (UCSC *Gene Browser*, NCBI *Map Viewer*) (Tabela 3). A descrição da alteração com os pontos de quebra de acordo com o ISCN (2013) é: arr 10q26.12-q26.3 (122.085.501-135.053.489)x1. A primeira quebra não envolveu nenhum gene, entretando, a segunda quebra ocorreu (região 10:135.053.489) no 3º intron do gene *Polyamine Oxidase (exo-N4-amino) (PAOX)* (Figura 10).

(A)



(B)

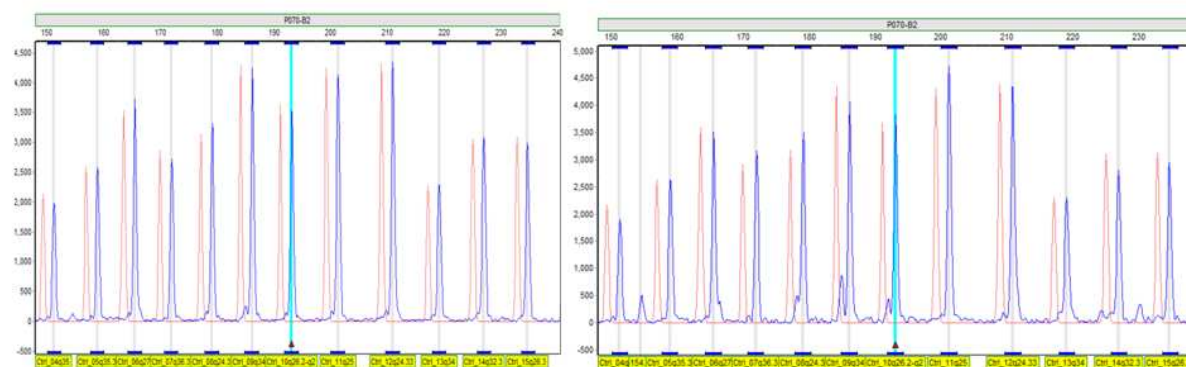
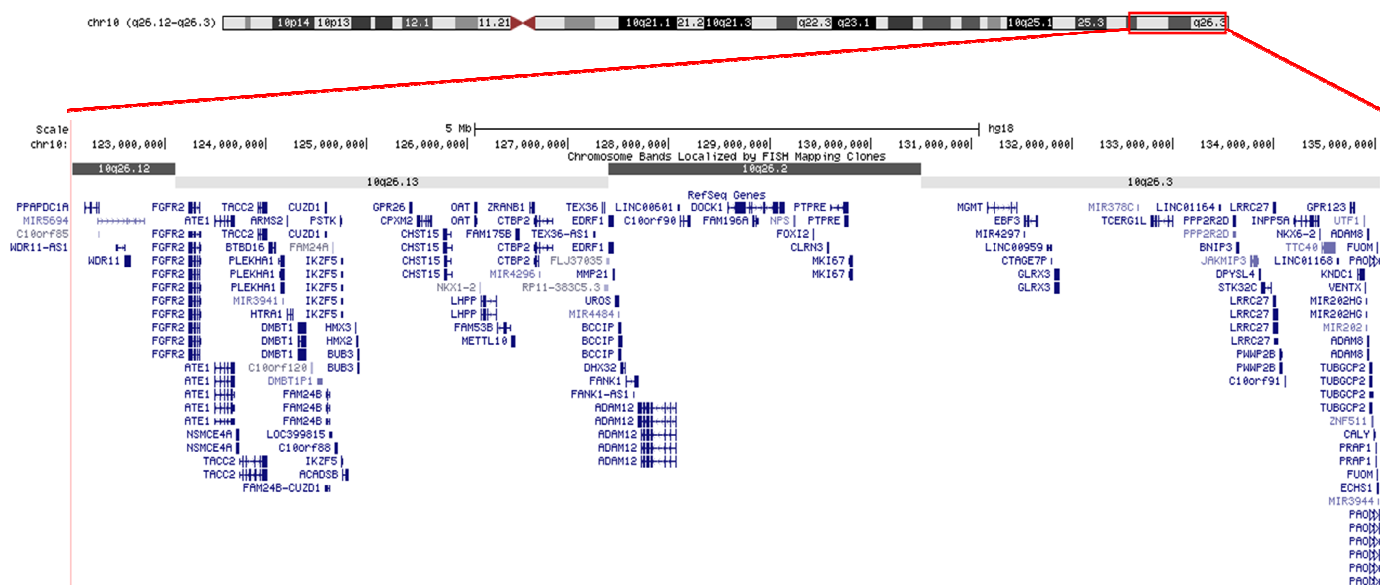
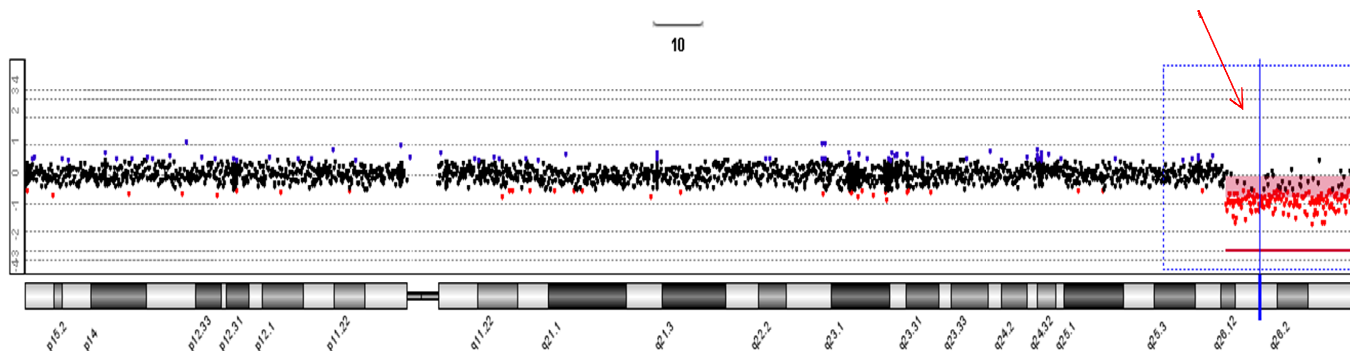


Figura 8: Resultados do MLPA paciente 1 e dos seus pais. A. Resultado de MLPA do paciente 1 usando o kit P070 (esquerda) e kit P036 (direita) em comparação com uma média populacional no software GeneMarker®. Foi detectada uma deleção subtelomérica na região 10q26.12-q26.3. B. Eletroferograma do MLPA do pai (direita) e da mãe (esquerda). Em ambos não foi detectada alterações.

(A)



(B)



(C)

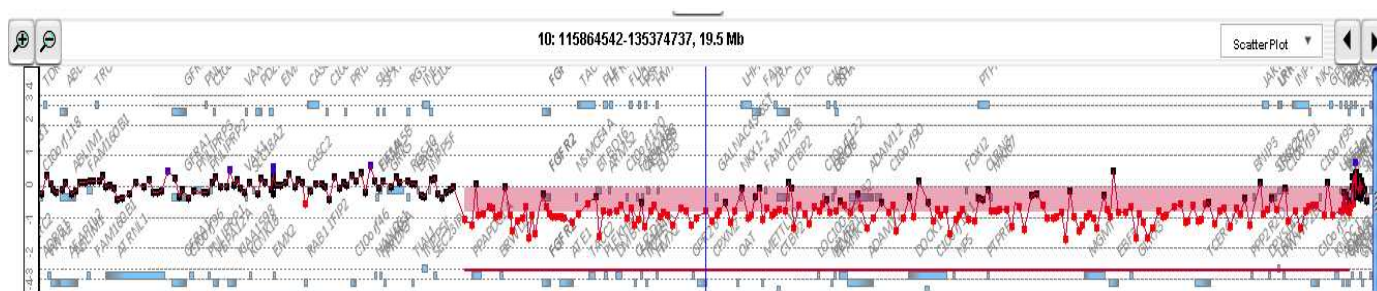


Figura 9: A. Ideograma do cromossomo 10 mostrando a posição da deleção no braço longo (retângulo). Em detalhe, os genes localizados na área deletada. B. Perfil do aCGH no cromossomo 10 do paciente. Seta vermelha destaca o sítio da deleção. C. Visão em alta resolução do segmento deletado de 12,967,989 bp 10q26.12-q26.3.



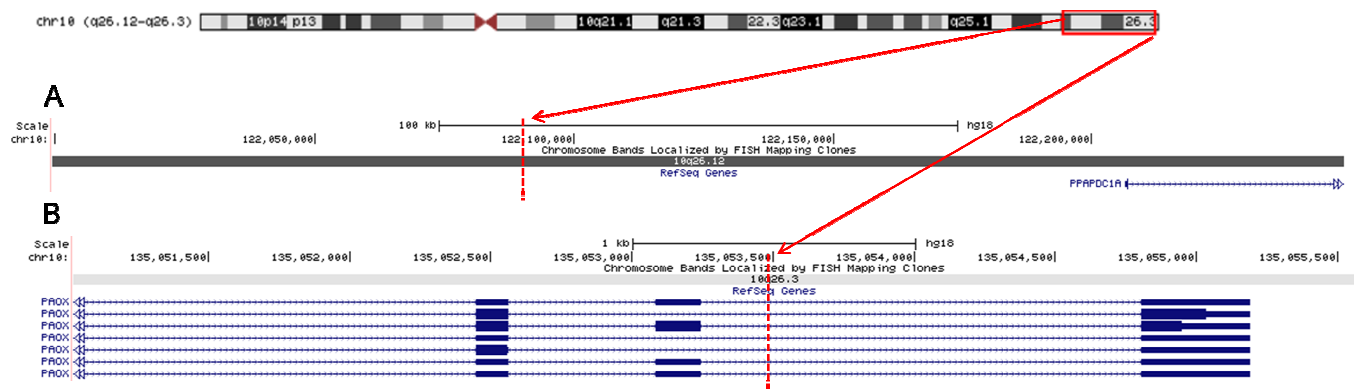


Figura 10: A. Ideograma do cromossomo 10 mostrando a posição da deleção no braço longo (barra). B. O traço vermelho destaca região onde houve quebra na região 10:122.085.501 onde nenhum gene foi quebrado. C. O traço vermelho destaca a região intrônica do gene PAOX onde ocorreu a 2ª quebra (10;135.053.489).

Os genes *fibroblast growth factor receptor 2* (*FGFR2*), *VENT homeobox homolog* (*Xenopus laevis*) (*VENTX*), *protein tyrosine phosphatase, receptor type, E* (*PTPRE*), *NK1 homeobox 2* (*NKX1-2*) *NK6 homeobox 2* (*NKX6-2*), *H6 family homeobox 3* (*HMX-3*) e *H6 family homeobox 2* (*HMX-2*) foram selecionados como candidatos para craniossinostose.

TABELA 3 - Relação de genes RefSeq e OMIM localizados na região 10q26.12-10q26.3

Início	Final	Símbolo	Região	OMIM	Nome
122600685	122659026	BRWD2	10q26	606417	<i>bromodomain and WD repeat domain containing 2</i>
123227845	123347962	<b>FGFR2</b>	10q26	176943	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>
123492615	123677536	ATE1	10q26.13	607103	<i>arginyltransferase 1</i>
123738679	124004047	TACC2	10q26	605302	<i>transforming, acidic coiled-coil containing protein 2</i>
124020811	124087666	BTBD16	10q26.13		<i>BTB (POZ) domain containing 16</i>
124124210	124181856	PLEKHA1	10q26.13	607772	<i>pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1</i>
124204169	124206858	ARMS2	10q26.13	611313	<i>age-related maculopathy susceptibility 2</i>
124211047	124264413	HTRA1	10q26.3	602194	<i>HtrA serine peptidase 1</i>
124310171	124393242	DMBT1	10q25.3-q26.1	601969	<i>deleted in malignant brain tumors 1</i>
124447215	124449328	C10orf120	10q26.13		<i>chromosome 10 open reading frame 120</i>
124506200	124547151	FLJ46361	10q26.13		<i>deleted in malignant brain tumors 1 pseudogene</i>
124581664	124595681	CUZD1	10q26.13		<i>CUB and zona pellucida-like domains 1</i>
124598600	124629147	FAM24B	10q26.13		<i>family with sequence similarity 24, member B</i>
124660207	124662617	FAM24A	10q26.13		<i>family with sequence similarity 24, member A</i>
124680409	124703909	C10orf88	10q26.13		<i>chromosome 10 open reading frame 88</i>

Continuação

124729546	124739896	PSTK	10q26.13	611310	<i>phosphoseryl-tRNA kinase</i>
124743187	124758301	IKZF5	10q26	606238	<i>IKAROS family zinc finger 5 (Pegasus)</i>
124758419	124807796	ACADSB	10q26.13	600301	<i>acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain</i>
124885557	124887237	<b>HMX3</b>	10q26.13		<i>H6 family homeobox 3</i>
124897628	124900178	<b>HMX2</b>	10q25.2-q26.3		<i>H6 family homeobox 2</i>
124903860	124914871	BUB3	10q26	603719	<i>BUB3 budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast)</i>
125415861	125444113	GPR26	10q26.2	604847	<i>G protein-coupled receptor 26</i>
125495142	125641490	CPXM2	10q26.13		<i>carboxypeptidase X (M14 family), member 2</i>
125741174	125742177	LOC100124332	10q26.13		<i>Y box binding protein 2 pseudogene</i>
125757174	125796231	GALNAC4S-6ST	10q26	608277	<i>B cell RAG associated protein</i>
126075862	126097441	OAT	10q26	258870	<i>ornithine aminotransferase (gyrate atrophy)</i>
126122343	126122802	OATL3	10q26		<i>ornithine aminotransferase-like 3 (pseudogene)</i>
126125988	126128534	<b>NKX1-2</b>	10q26.13		<i>NK1 homeobox 2</i>
126140402	126292699	LHPP	10q26.13		<i>phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase</i>
126437396	126470429	LOC399818	10q26.13		<i>similar to CG9643-PA</i>
126480344	126515229	KIAA0157	10q26.13	611144	<i>KIAA0157</i>
126620682	126665995	ZRANB1	10q26.13	611749	<i>zinc finger, RAN-binding domain containing 1</i>
126666408	126839614	CTBP2	10q26.13	602619	<i>C-terminal binding protein 2</i>
126845236	126845499	MRPS21P6	10q26		<i>mitochondrial ribosomal protein S21 pseudogene 6</i>
127344579	127346853	ALDOAP2	10q26.13		<i>aldolase A, fructose-bisphosphate pseudogene 2</i>
127398074	127442702	C10orf137	10q26.13-q26.2		<i>chromosome 10 open reading frame 137</i>
127467142	127501757	UROS	10q25.2-q26.3	606938	<i>uroporphyrinogen III synthase (congenital erythropoietic porphyria)</i>
127502105	127532080	BCCIP	10q26.1		<i>BRCA2 and CDKN1A interacting protein</i>
127514899	127559874	DHX32	10q26.2	607960	<i>DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 32</i>
127575098	127688151	FANK1	10q26.2	611640	<i>fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1</i>
127693415	128067055	ADAM12	10q26.3	602714	<i>ADAM metallopeptidase domain 12 (meltrin alpha)</i>
128103561	128200000	C10orf90	10q26.2		<i>chromosome 10 open reading frame 90</i>
128658955	129140770	<b>DOCK1</b>	10q26.13-q26.3	601403	<i>dedicator of cytokinesis 1</i>
128823680	128884412	C10orf141	10q26.2		<i>chromosome 10 open reading frame 141</i>
129237603	129240925	NPS	10q26.2	609513	<i>neuropeptide S</i>
129425942	129429440	FOX12	10q26.2		<i>forkhead box 12</i>
129566104	129581201	CLRN3	10q26.2		<i>clarin 3</i>

Continuação

129595315	129774155	<b>PTPRE</b>	10q26	600926	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, E</i>
129784913	129814645	<b>MKI67</b>	10q25-qter	176741	<i>antigen identified by monoclonal antibody Ki-67</i>
131155456	131455358	<b>MGMT</b>	10q26	156569	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
131523537	131652081	<b>EBF3</b>	10q26.3	607407	<i>early B-cell factor 3</i>
131794263	131797092	<b>CTAGEP</b>	10q26.3		<i>CTAGE family pseudogene</i>
131824653	131867860	<b>GLRX3</b>	10q26		<i>glutaredoxin 3</i>
133597950	133620044	<b>PPP2R2D</b>	10q26.3		<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B, delta isoform</i>
133631194	133645425	<b>BNIP3</b>	10q26.3	603293	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>
133850394	133869256	<b>DPYSL4</b>	10q26	608407	<i>dihydropyrimidinase-like 4</i>
133870986	133971467	<b>STK32C</b>	10q26.3		<i>serine/threonine kinase 32C</i>
133995694	134043412	<b>LRRC27</b>	10q26.3		<i>leucine rich repeat containing 27</i>
134108704	134111815	<b>C10orf91</b>	10q26.3		<i>chromosome 10 open reading frame 91</i>
134448310	134449527	<b>NKX6-2</b>	10q26	605955	<i>NK6 homeobox 2</i>
134471886	134521226	<b>C10orf92</b>	10q26.3		<i>chromosome 10 open reading frame 92</i>
134751399	134795169	<b>GPR123</b>	10q26		<i>G protein-coupled receptor 123</i>
134823961	134889906	<b>KNDC1</b>	10q26.3		<i>kinase non-catalytic C-lobe domain (KIND) containing 1</i>
134893768	134895052	<b>UTF1</b>	10q26	604130	<i>undifferentiated embryonic cell transcription factor 1</i>
134901398	134905423	<b>VENTX</b>	10q26.3	607158	<i>VENT homeobox homolog (Xenopus laevis)</i>
134925911	134940362	<b>ADAM8</b>	10q26.3	602267	<i>ADAM metalloproteinase domain 8</i>
134943128	134972634	<b>TUBGCP2</b>	10q26.3		<i>tubulin, gamma complex associated protein 2</i>
134972413	134976656	<b>ZNF511</b>	10q26.3		<i>zinc finger protein 511</i>
135010901	135016177	<b>PRAP1</b>	10q26.3	609776	<i>proline-rich acidic protein 1</i>
135018648	135021519	<b>C10orf125</b>	10q26.3		<i>chromosome 10 open reading frame 125</i>
135042731	135055188	<b>PAOX</b>	10q26.3		<i>polyamine oxidase (exo-N4-amino)</i>

## 4.2 Pacientes 2, 3, 4 e 5.

### 4.2.1 Paciente 2

L.M.R., foi atendido pela 1ª vez no CEGH com 6 meses (Figura 11a). No exame clínico foi diagnosticado o fechamento pré



maturo da sutura metópica e sindactilia do 2º e 3º artelhos do pé direito. A Tomografia computadorizada 3D confirmou a trigonocefalia com sinais de compressão de cérebro (Figura 11b). Foi observada agenesia do rim esquerdo.

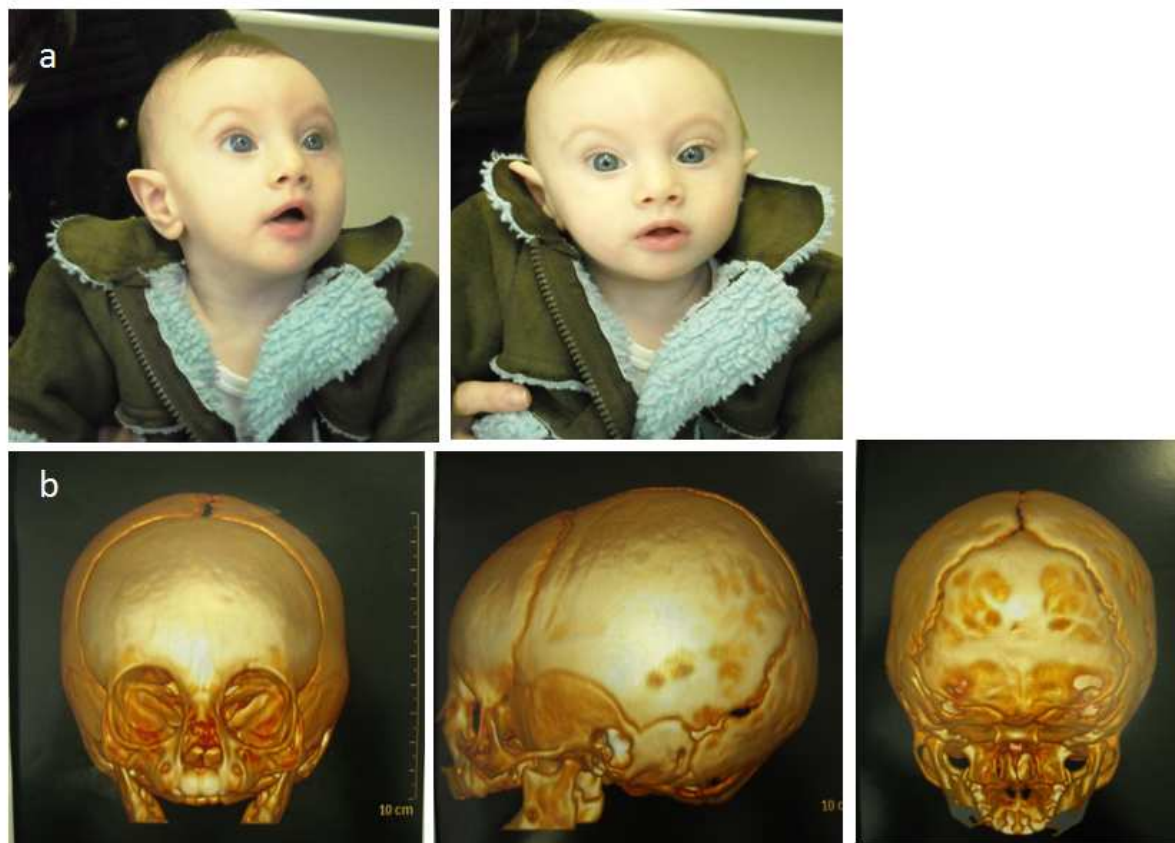
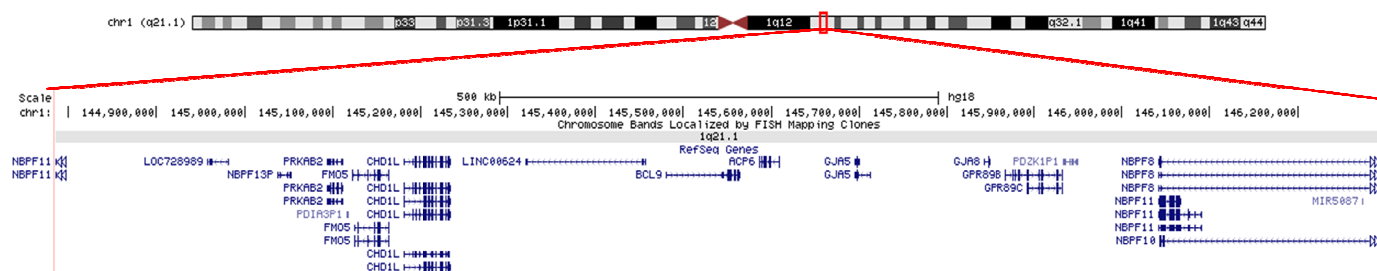


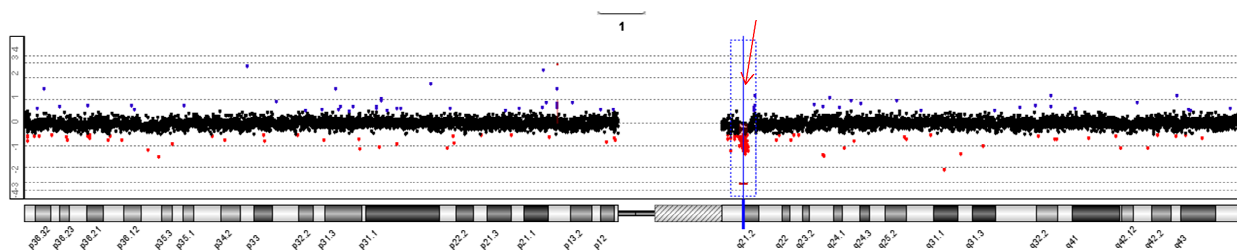
Figura 11: Fotos do paciente 2 a) paciente com 6 meses. Note a malformação das orelhas. b) Detalhes da tomografia computadorizada 3D do crânio. Note a sutura metópica fechada. Fonte: Arquivo do CEGH.

A análise por aCGH revelou uma deleção no braço longo do cromossomo 1 em 1q21.1.22 (1:144.785.370-146.294.653; GRCh37/hg19) com 1,509,284 pb (Figura 12) abrangendo 29 genes RefSeq, estando 14 presentes no OMIM (UCSC *Gene Browser*, NCBI *Map Viewer*) (Tabela 4). A descrição da alteração com os pontos de quebra de acordo com o ISCN (2013) é: arr 1q21.1 (144.785.370-146.294.653)x1. A quebra proximal ocorreu no 4ª intron do gene *neuroblastoma breakpoint family, member 11 (NBPF11)*. E a quebra terminal ocorreu nos introns dos genes *neuroblastoma breakpoint family, member 8 (NBPF8)* e *neuroblastoma breakpoint family, member 10 (NBPF10)* (Figura 13). O MLPA do DNA dos pais não pode ser realizado devido a qualidade da amostra.

(A)



(B)



(C)

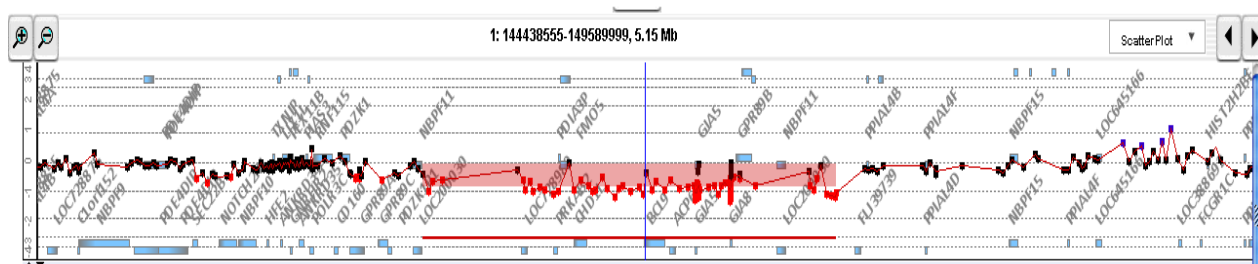


Figura 12: A. Ideograma do cromossomo 1 mostrando a posição da deleção no braço longo (barra). Em detalhe, os genes localizados na área deletada. B. Perfil do aCGH no cromossomo 1 do paciente [arr 1q21.1 (144.785.370-146.294.653)x1]. A seta vermelha destaca o sítio da deleção. C. Visão de alta resolução do segmento deletado de 1,5 Mb na região 1q21.1.

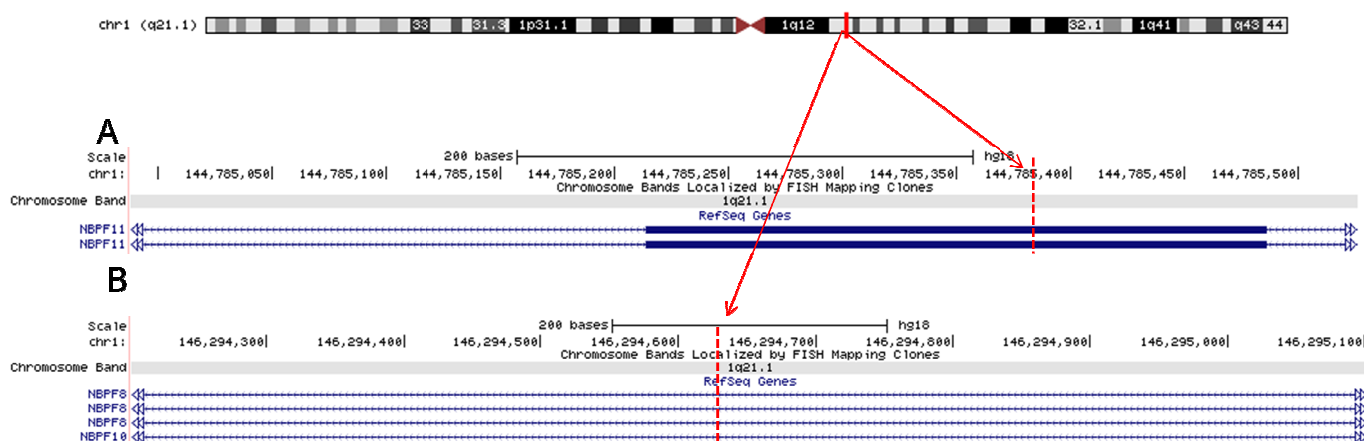


Figura 13: Ideograma do cromossomo 1 mostrando a posição da deleção no braço longo (barra). A. A linha vermelha destaca região onde houve quebra na região 1:144,785,370. B. A linha vermelha destaca a região de quebra onde ocorreu a 2ª quebra, região 1:146,294,653.

Os genes *phosphodiesterase 4D interacting protein (PDEPDIP4)*, *protein inhibitor of activated STAT, 3 (PIAS3)*, *hemochromatosis type 2 (juvenile) (HFE2)* e

*Hydrocephalus-Inducing Homolog Of Mouse 2 (HYDIN2)* foram selecionados como candidatos para craniossinotose.

**TABELA 4 - Relação dos genes RefSeq e OMIM localizados na região 1q21.1**

Início	Final	Símbolo	Região	OMIM	Nome
144811743	144830407	NBPF9	1q21.1	613999	<i>neuroblastoma breakpoint family, member 9</i>
144851424	145076186	<b>PDE4DIP</b>	1q12	608117	<i>phosphodiesterase 4D interacting protein</i>
145176379	145286270	NOTCH2NL	1q21.2		<i>notch 2 N-terminal like</i>
145293371	145368684	NBPF10	1q21.1	614000	<i>neuroblastoma breakpoint family, member 10</i>
145413191	145417545	<b>HFE2</b>	1q21.1	608374	<i>hemochromatosis type 2 (juvenile)</i>
145438438	145442635	TXNIP	1q21.1	606599	<i>thioredoxin interacting protein</i>
145456236	145476081	POLR3GL	1q21.1		<i>polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD)-like</i>
145470508	145475647	ANKRD34A	1q21.1		<i>ankyrin repeat domain 34A</i>
145477059	145501670	LIX1L	1q21.1		<i>Lix1 homolog (mouse)-like</i>
145507557	145513536	RBM8A	1q21.1	605313	<i>RNA binding motif protein 8A</i>
145509820	145516076	GNRHR2	1q12	612875	<i>gonadotropin-releasing hormone (type 2) receptor 2</i>
145516165	145523732	PEX11B	1q21.1	603867	<i>peroxisomal biogenesis factor 11 beta</i>
145524709	145543868	ITGA10	1q21	604042	<i>integrin, alpha 10</i>
145549209	145568526	ANKRD35	1q21.1		<i>ankyrin repeat domain 35</i>
145575257	145586546	<b>PIAS3</b>	1q21	605987	<i>protein inhibitor of activated STAT, 3</i>
145586491	145589435	NUDT17	1q21.1		<i>nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 17</i>
145592605	145610972	POLR3C	1q21.1		<i>polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide C (62kD)</i>
145610990	145689005	RNF115	1q21.1		<i>ring finger protein 115</i>
145695798	145715639	CD160	1q21.1	604463	<i>CD160 molecule</i>
145727662	145764207	PDZK1	1q21	603831	<i>PDZ domain containing 1</i>
145764595	145827103	GPR89A	1q21.1	612821	<i>G protein-coupled receptor 89A</i>
145883858	145924049	GPR89C	1q21.1		<i>G protein-coupled receptor 89C</i>
145924388	145942619	PDZK1P1	1q21.1		<i>PDZ domain containing 1 pseudogene 1</i>
145941579	145941649	TRNAR33P	1q21.1		<i>transfer RNA arginine 33 (anticodon CCU) pseudogene</i>
145969270	145969433	RNVU1-7	1q21.1		<i>RNA, variant U1 small nuclear 7</i>
146011088	146024377	LOC100421282			<i>phosphodiesterase 4D interacting protein pseudogene</i>
146032542	146082633	NBPF11	1q21.1	614001	<i>neuroblastoma breakpoint family, member 11</i>
146059806	146060584	PFN1P5	1q21.1		<i>profilin 1 pseudogene 5</i>
146076509	146080231	ABHD17AP2	1q21.1		<i>abhydrolase domain containing 17A pseudogene 2</i>
146547489.. *	146822034*	<b>HYDIN2</b>	1q21.1	610813	<i>Hydrocephalus-Inducing Homolog Of Mouse 2</i>

### 4.2.2 Paciente 3

V.S.R, foi atendido pela 1ª vez no CEGH com 2 anos (Figura 14a). No exame clínico o paciente fazia uso de óculos e foi detectado trigonocefalia, facies sindrômica com implantação baixa de orelhas, hipospádia e criptorquidia. Ausência de problema cardíaco. Trigonocefalia foi confirmada pelo exame de tomografia computadorizada do crânio (Figura 14b).

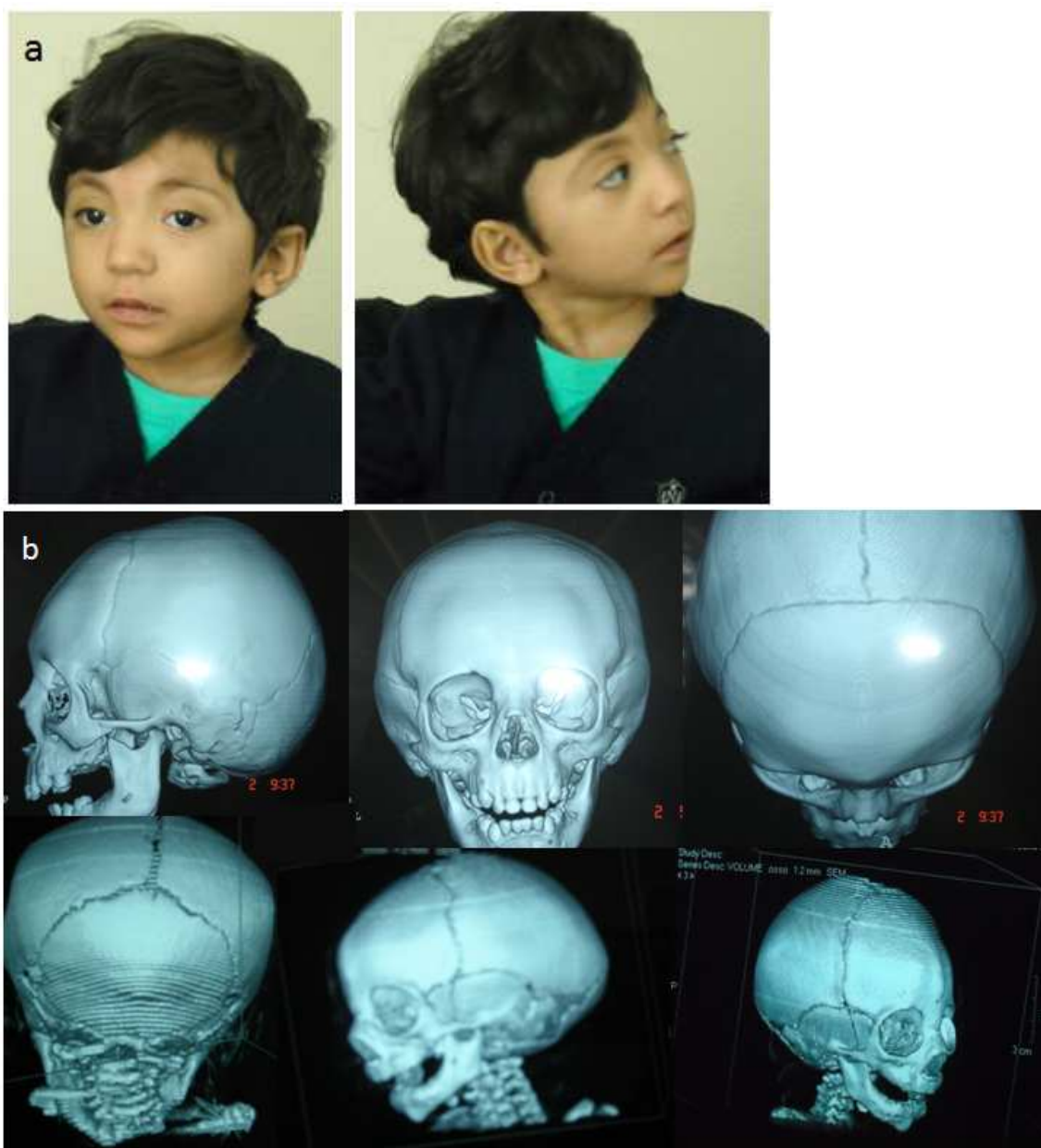
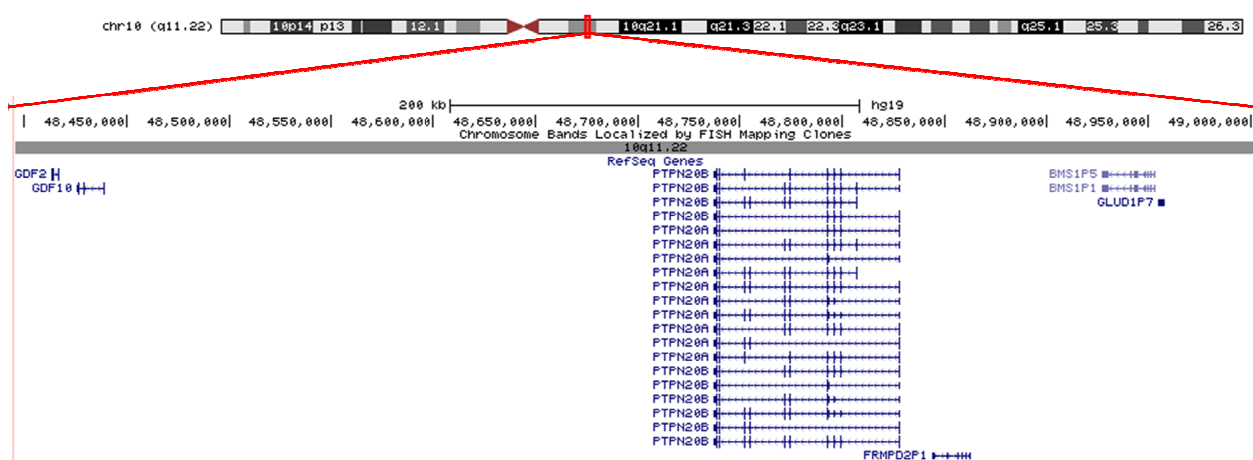


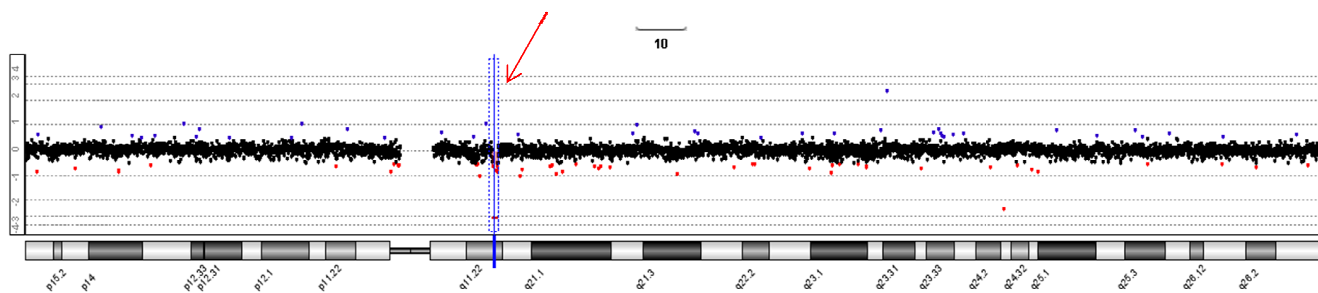
Figura 14: Fotos do paciente 3 a) Paciente com 2 anos; b) Imagens da tomografia computadorizada do crânio. Note a sutura metópica fechada. Fonte: Arquivo do CEGH.

A análise por aCGH revelou uma deleção no braço longo do cromossomo 10 em 10q11.22 (10:48.395.672-49.021.064;GRCh37/hg19) com 625,393 pb (Figura 15) abrangendo 10 genes RefSeq (UCSC *Genome Browser*, NCBI *Map Viewer*). Destes, apenas 3 são cadastrados no OMIM, porém nenhum está associado a doença (Tabela 5). A descrição da alteração com os pontos de quebra de acordo com o ISCN (2013) é: arr 10q11.22 (48.395.672-49.021.064)x1. As duas quebras não envolveram nenhum gene (Figura 16). O estudo citogenético do paciente e do DNA dos pais não pode ser realizado devido a qualidade da amostra.

(A)



(B)



(C)

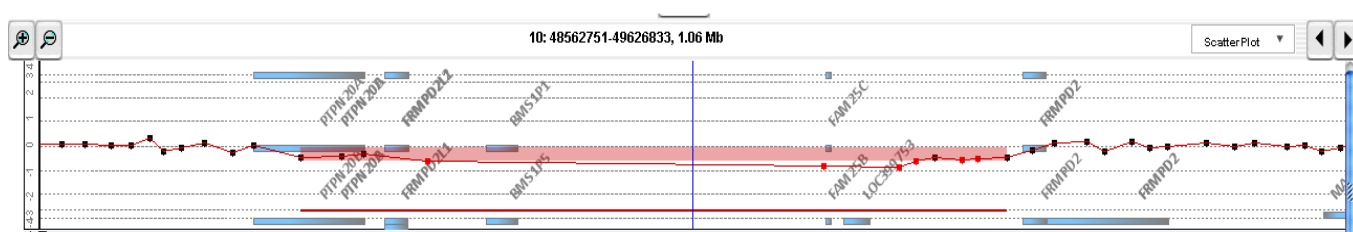


Figura 15: A. Ideograma do cromossomo 10 mostrando a posição da deleção no braço longo (barra). Em detalhe, os genes localizados na área deletada. B. Perfil do aCGH no cromossomo 10 do paciente [arr 10q11.22 (48.395.672-49.021.064)x1]. A seta vermelha destaca o sítio da deleção. C. Visão de alta resolução do segmento deletado de 0,625 Mb na região 10q11.22.



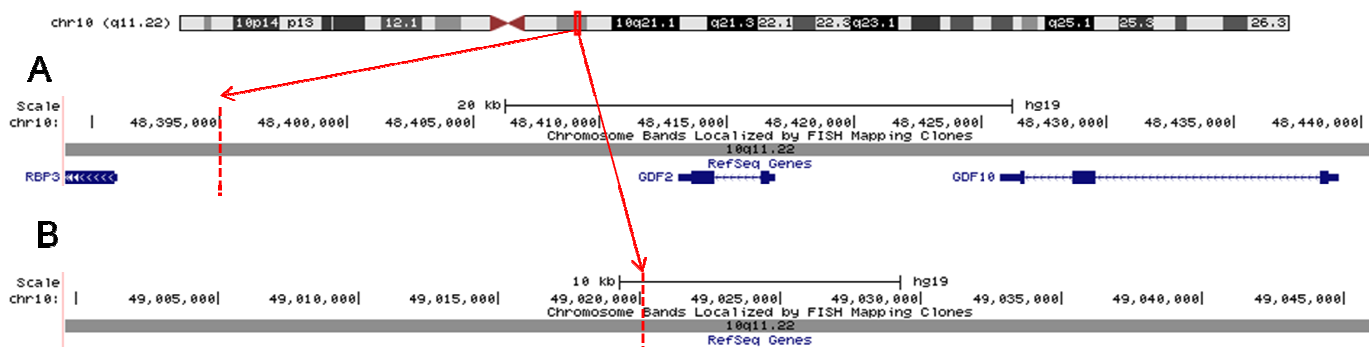


Figura 16: Ideograma do cromossomo 10 mostrando a posição da deleção no braço longo (barra). A. O traço vermelho destaca a região onde houve quebra na região 10:48.395.672. B. O traço vermelho destaca a região de quebra onde ocorreu a 2ª quebra. Região 10:49.021.064.

Os genes *growth differentiation factor 2* (*GDF2*) e '*growth differentiation factor 10* (*GDF10*) foram selecionados como candidatos ao fenótipo de craniossinostose.

TABELA 5 - Relação de genes RefSeq e OMIM localizados na região 10q11.22

Início	Final	Símbolo	Região	OMIM	Nome
48413092	48416853	<b>GDF2</b>	10q11.22	605120	growth differentiation factor 2
48425785	48439138	<b>GDF10</b>	10q11.22	601361	growth differentiation factor 10
48737042	48827942	<b>PTPN20B</b>	10q11.22	610631	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 20B
48844036	48862688	FRMPD2P1	10q11.22		FERM and PDZ domain containing 2 pseudogene 1
48865533	48868504	LOC100420617			FERM and PDZ domain containing 2 pseudogene
48903537	48922780	CTGLF9P	10q11.22		centaurin, gamma-like family, member 9 pseudogene
48927373	48952629	BMS1P5	10q11.22		BMS1 pseudogene 5
48962451	48968666	GLUD1P2	10q11.2		glutamate dehydrogenase 1 pseudogene 2
48963054	48966662	LOC728813	10q11.22		dual specificity phosphatase 8 pseudogene
48980297	48981273	CTSLP3	10q11.22		cathepsin L pseudogene 3

4.2.3 Paciente 4

A.B.S, foi atendido pela primeira vez no CEGH com 1 ano e 10 meses (Figura 17). No exame clínico foram observados escafocefalia e microcefalia. Nariz bulboso com columela alongada e narinas alargadas, filtro profundo, retrognatia e orelhas proeminentes. Prega palmar única à direita. Sem visceromegalia. Testículos tópicos. Hemangioma plano em glabella e coluna.



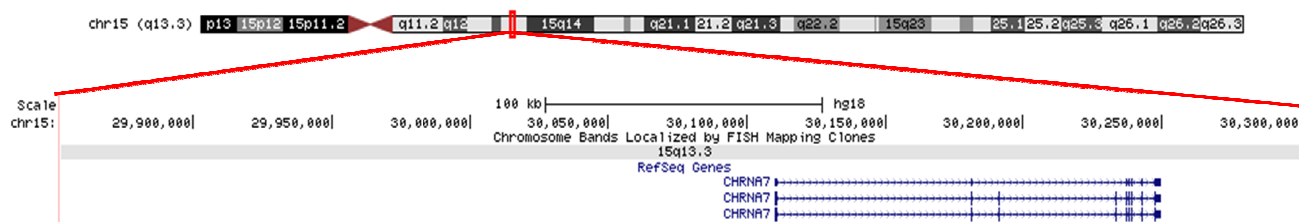
Figura 17: Paciente com 1 ano e 10 meses. Note as orelhas proeminentes, nariz bulboso com columela alongada e narinas alargadas e filtro profundo. Pai com fácies síndrome.

A análise por aCGH revelou uma duplicação no braço longo do cromossomo 15 em 15q13.3 (15:29.852.369-30.302.249;build36/hg18) com 449,881 pb abrangendo um gene RefSeq (UCSC *Genome Browser*, NCBI *Map Viewer*), o *cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (CHRNA7)* (Figura 18) também presente no OMIM (Tabela 6). A descrição da alteração com os pontos de quebra de acordo com o ISCN (2013) é: arr 15q13.3 (29.852.369-30.302.249)x3. Nenhuma das duas quebras envolveu genes (Figura 19). Os DNAs dos pais foram estudados por MLPA e a mãe apresentou resultado normal e o pai possui duplicação do gene CHRNA7 na região 15q13.3 (Figura 20).

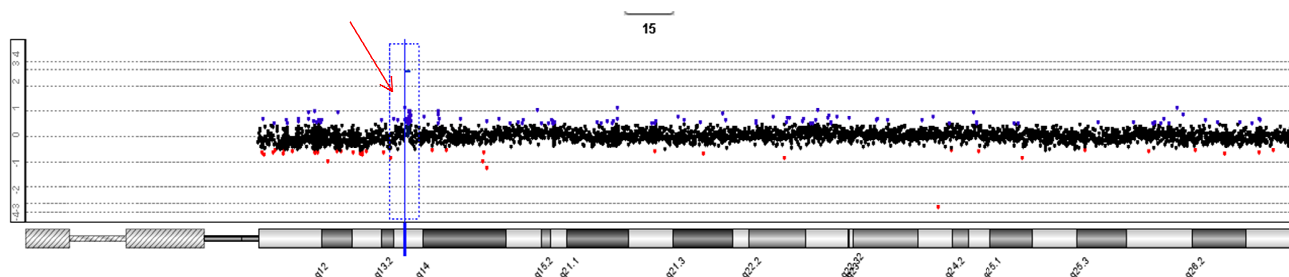
**TABELA 6 - Relação de genes localizados na região 15q13.3**

Início	Final	Símbolo	Região	OMIM	Nome
30055543	30055992	LOC100130857	15q13.3		<i>hypothetical protein LOC100130857</i>
30110018	30248541	<b>CHRNA7</b>	15q14	118511	<i>cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7</i>

(A)



(B)



(C)

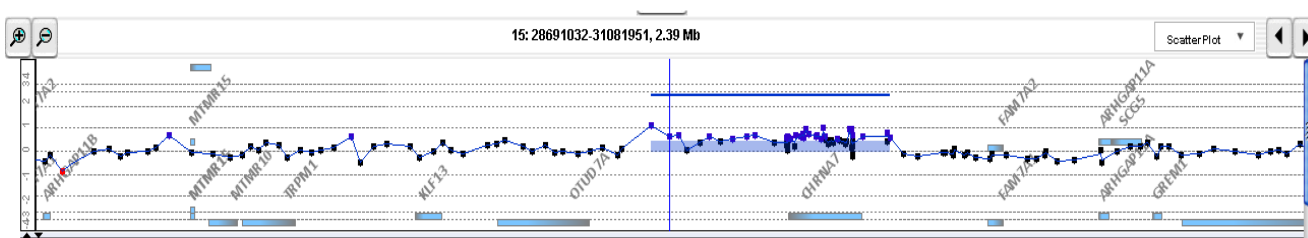


Figura 18: A. Ideograma do cromossomo 15 mostrando a posição da duplicação no braço longo (barra). Em detalhe, os genes localizados na área duplicada. B. Perfil do aCGH no cromossomo 15 do paciente [arr 15q13.3 (29.852.369-30.302.249)x3]. A seta vermelha destaca o sítio da deleção. C. Visão de alta resolução do segmento deletado de 0,46 Mb na região 15q13.3.

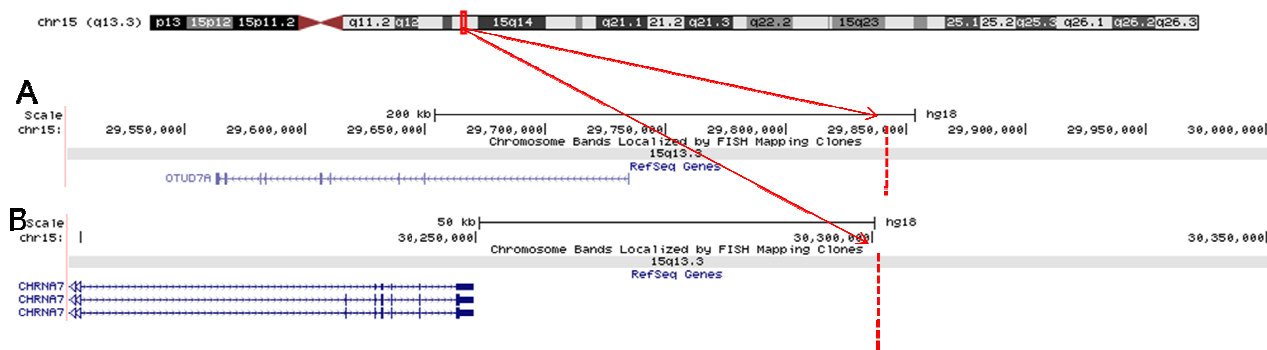


Figura 19: Ideograma do cromossomo 15 mostrando a posição da duplicação no braço longo (barra). A. O traço vermelho destaca região onde houve quebra na região 15:29.852.369. B. O traço vermelho destaca a região de quebra onde ocorreu a 2ª quebra, região 15:30.302.249.



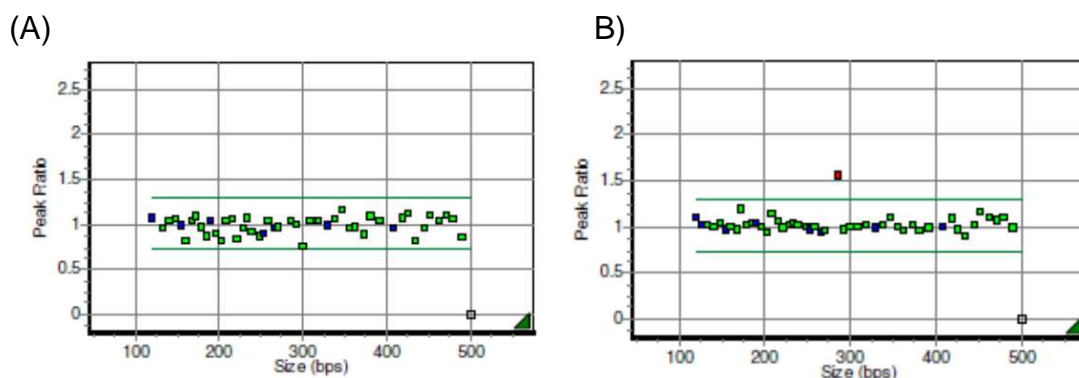


Figura 20. Diagramas dos resultados de MLPA dos pais do paciente 4 em comparação com uma média populacional no software GeneMarker®. Na figura A. não foi detectada microdeleções ou microduplicações na amostra analisada (cromossomos normal/normal) da mãe. Na figura B. foi detectada uma microduplicação na amostra do pai. A sonda duplicada corresponde ao gene *CHRNA7*.

#### 4.2.4 Paciente 5

A.B.C., foi atendido pela primeira vez no CEGH aos 9 anos (Figura 21). No exame clínico foram observados trigonocefalia e escafocefalia. Agenesia de 4 dentes permanentes (12, 22, 35, 45) e diástema acentuada entre 11 e 21. Hipoplasia da falange do 5º dedo esquerdo e pé esquerdo em posição equinovaro. Prega palmar transversa única bilateral, prega única de flexão em 5 dedos. Braquidactilia. Pé esquerdo varo redutível.



Figura 21: Paciente com 9 anos. Note: hipoplasia da falange do 5º dedo esquerdo, prega palmar transversa única bilateral, prega única de flexão em 5 dedos e braquidactilia.

A análise por aCGH revelou uma deleção no braço curto do cromossomo 2 em 2p25.1-p24.1 (10.557.273-19.936.826; build36/hg18) com 9,379,554 pb abrangendo 27 genes RefSeq (Figura 22) (UCSC *Genome Browser*, NCBI *Map Viewer*) e 18 presentes no OMIM (Tabela 7). A descrição da alteração com os pontos de quebra de acordo com o ISCN (2013) é: arr 2p25.1-p24.1 (10.557.273-19.936.826)x1. A 1ª quebra não ocorreu em gene, já a segunda quebra ocorreu no gene *Long intergenic non-protein coding RNA 954* (LINC00954) (Figura 23). Os DNAs dos pais foram estudados por MLPA e apresentaram resultados sem alterações (Figura 24).

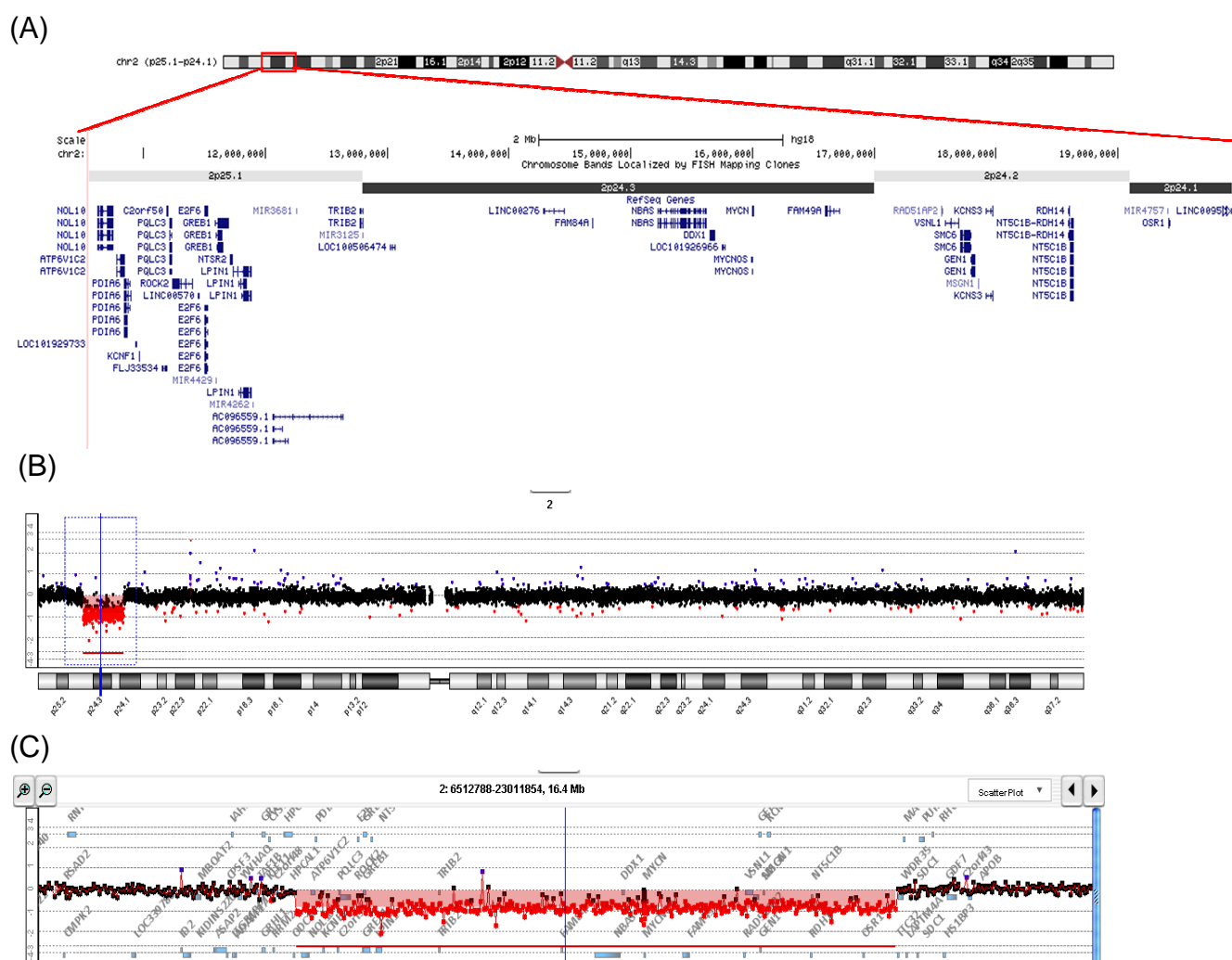


Figura 22: A. Ideograma do cromossomo 2 mostrando a posição da deleção no braço curto (retângulo). Em detalhe, os genes localizados na área deletada. B. Perfil do aCGH no cromossomo 2 do paciente [arr 2p25.1-p24.1 (10.557.273-19.936.826)x1]. A seta vermelha destaca o sítio da deleção. C. Visão de alta resolução do segmento deletado de 9,38 Mb na região 2q13.3.

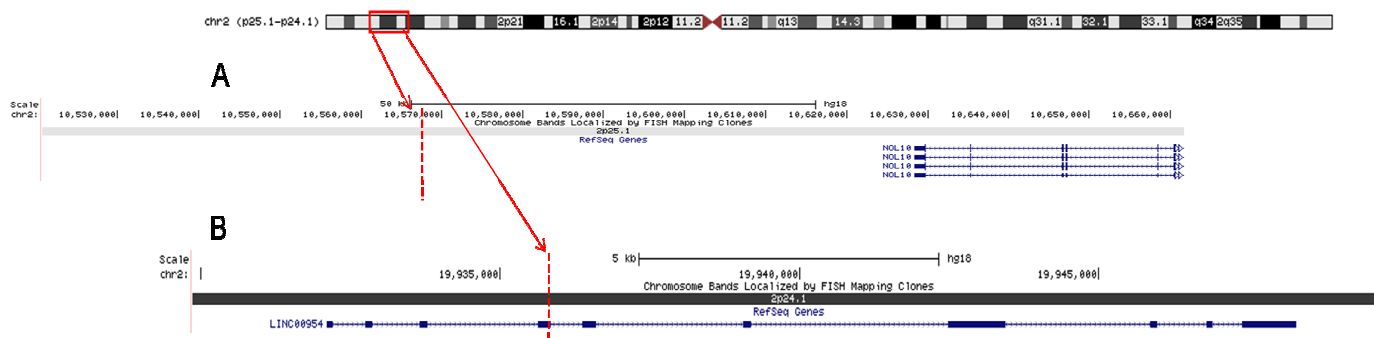


Figura 23: Ideograma do cromossomo 2 mostrando a posição da deleção no braço curto (barra). A. A linha vermelha destaca região onde houve quebra na região 10.557.273. B. A linha vermelha destaca a região de quebra onde ocorreu a 2ª quebra, região 19.936.826.

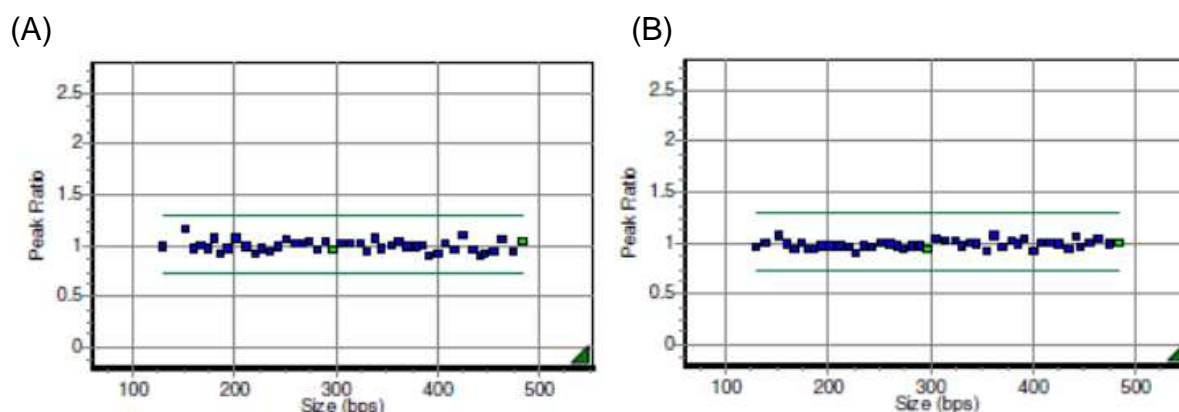


Figura 24: Diagramas dos resultados dos pais do paciente 5 em comparação com uma média populacional no software GeneMarker®. Na figura A. não foi detectada microdeleções ou microduplicações na amostra analisada (cromossomos normal/normal) da mãe. B. Não foi detectada microdeleções ou microduplicações na amostra analisada (cromossomos normal/normal) do pai.

Os genes *myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived* (avian) MYCN), *Lipin 1* (LPIN1), *Structural Maintenance Of Chromosomes 6* (SMC6) e *E2F transcription factor 6* (E2F6) foram selecionados como candidatos para a craniossinotose.

TABELA 7 - Relação de genes RefSeq e OMIM localizados na região 2p25.1-p24.1

Início	Final	Símbolo	Região	OMIM	Nome
10628345	10747549	NOL10	2p25.1		nucleolar protein 10
10779226	10842687	ATP6V1C2	2p25.1		ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2
10840968	10870411	PDIA6	2p25.1	611099	protein disulfide isomerase family A, member 6
10969514	10971802	KCNF1	2p25	603787	potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1
11190630	11203603	C2orf50	2p25.1		chromosome 2 open reading frame 50
11212991	11236451	PQLC3	2p25.1		PQ loop repeat containing 3
11239229	11402162	ROCK2	2p24	604002	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2
11501952	11523748	<b>E2F6</b>	2p25.1	602944	E2F transcription factor 6
11591693	11700363	GREB1	2p25.1	611736	GREB1 protein
11715756	11727876	NTSR2	2p25.1	605538	neurotensin receptor 2
11804191	11884986	<b>LPIN1</b>	2p25.1	605518	lipin 1
12774659	12800311	TRIB2	2p25.1-p24.3	609462	tribbles homolog 2 (Drosophila)
14690307	14693898	FAM84A	2p24.3	611234	family with sequence similarity 84, member A
15224483	15618905	NAG	2p24	608025	neuroblastoma-amplified protein
15649221	15688676	DDX1	2p24	601257	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1
15998134	16004580	<b>MYCN</b>	2p24.1	164840	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
16597382	16710580	FAM49A	2p24.3		family with sequence similarity 49, member A
17555467	17563187	RAD51AP2	2p24.2		RAD51-associated protein 2
17585288	17701187	VSNL1	2p24.3	600817	visinin-like 1
17708562	17798541	<b>SMC6</b>	2p24.2	609387	structural maintenance of chromosomes 6
17798658	17826911	GEN1	2p24.2		Gen homolog 1, endonuclease (Drosophila)
17861267	17861848	MSGN1	2p24.2		mesogenin 1
17923426	17977706	KCNS3	2p24	603888	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 3
18599473	18605381	RDH14	2p24.2		retinol dehydrogenase 14 (all-trans/9-cis/11-cis)
18607618	18634319	NT5C1B	2p24.2	610526	5'-nucleotidase, cytosolic 1B
19414727	19421853	OSR1	2p24.1	608891	odd-skipped related 1 (Drosophila)
19889354	19890250	CISD1B	2p24.1		CDGSH iron sulfur domain 1B pseudogene

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram identificadas regiões cromossômicas e genes potencialmente envolvidos com craniossinostose associados a outras AC sem etiologia conhecida. A técnica de aCGH detectou anomalias estruturais em todos os pacientes, sendo quatro deleções e uma duplicação, que variaram entre 0,4 Mb a 12,9 Mb.

A paciente 1 possui uma deleção subtelomérica de 12,9 Mb na região subtelomérica do braço longo do cromossomo 10 que compreende 68 genes RefSeq e 40 genes presentes no OMIM. As regiões subteloméricas tem grande importância, uma vez que são ricas em genes e frequentemente está envolvida em rearranjos cromossômicos. Estima-se que 3 a 7% dos indivíduos com deficiência mental e anomalias congênitas múltiplas têm alterações subteloméricas não balanceadas, tornando o *screening* dessas regiões terminais uma importante parte na rotina de avaliação genética (RAUCH, et al 2006).

Deleções envolvendo a região terminal do 10q têm sido descritas desde 1978 (LEWANDOVSKI et al), sendo descritos mais de 100 casos. Em 86,5% dos casos, é causada por deleções terminais, e 13,5% intersticiais. Dessas deleções, 43% são *de novo* e 40% translocações familiares (Dados não publicados). Essa deleção caracteriza a síndrome de deleção terminal do cromossomo 10q26 (*Terminal Chromosome 10q26 Deletion Syndrome*; OMIM #609625), proposta por vários autores (MULCAHY et al, 1982; SHAPIRO, 1985; GORINATI et al, 1989; WULFSBERG et al, 1989; SCHRANDER-STUMPEL et al, 1991; PETIT et al 1998; MCCANDLESS et al, 2000) porém, existe uma considerável heterogeneidade nas características clínicas apresentadas mesmo entre casos de uma mesma família que compartilham o mesmo ponto de quebra na deleção (IRVING, 2003). Apesar da ampla variabilidade clínica observada nesses pacientes, sinais como dismorfismos faciais, têm sido citados na maior parte dos relatos. Além desses, anomalias digitais, anomalias cardíacas, anomalias genitais como criptorquidismo, sexo reverso e genitália ambígua, retardo no crescimento, atraso psicomotor e dificuldade no aprendizado também têm sido descritos. (WULFSBERG et al. 1989; WAGGONER,

1999; IRVING, 2003; KEHRER-SAWATZKI, 2005). Nossa paciente apresentou escafocefalia associada a várias AC e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM).

Tem sido sugerida a existência de uma região crítica mínima que resulta no fenótipo da síndrome de deleção do 10q, e que a haploinsuficiência de *dedicator of cytokinesis 1* (*DOCK1*) pode resultar em dimorfismo craniofacial bem como um espectro de outras manifestações clínicas, como anomalias cardíacas e urinárias, também observadas na paciente (YATSENKO, *et al* 2009; GUILHERME *et al.* 2013, COUNTERS, *et al* 2006). Há evidências que *DOCK1* no controle da morfologia, polaridade e migração celular, adesão às proteínas da matriz extracelular ou a outras células, proliferação, apoptose, tumorigênese, fagocitose, transporte vesicular e transcrição (YATSENKO, *et al* 2009). Entretanto, nenhum desses estudos associou a região mínima com craniossinostose.

Na análise dos pontos de quebra no UCSC observamos que a quebra na região 10:122.085.501 não ocorreu em nenhum gene, entretanto a quebra terminal na região 10:135.053.489 aconteceu no 3º íntron do gene *Polyamine Oxidase (exo-N4-amino)* (*PAOX*) (Figura 11). Esse gene codifica uma flavoenzima que cataliza a oxidação das poliaminas (espermina, espermidina, putrecina e agmatina), isto é, poliaminas são polications que interagem com moléculas carregadas negativamente, como DNA, RNA e lípidos. Assim, estão envolvidas na modulação do ciclo celular, remoção das espécies de oxigênio reativas, controle da expressão gênica, estabilidade do DNA, bem como o crescimento, proliferação e morte celular (BACHRACH, 1970), além de serem importantes na neurotransmissão (MINOIS, 2014). Embora exista extensa literatura sobre as funções das poliaminas, não foi encontrado nenhum estudo que relata os efeitos da perda de *PAOX* em doenças.

Na tentativa de verificar se há uma região cromossômica comum com craniossinostose em 10q25/q26-qter, realizamos uma análise comparativa da extensão das deleções de todos os pacientes. Observa-se que a penetrância da craniossinostose no grupo dos pacientes com deleção terminal entre os pontos de quebra 10q25 e q26-qter é relativamente baixa, tendo sido descrita em 37% dos

casos reportados (Dados não publicados). Três tipos de craniossinostose foram relatadas: 2 trigonocefalias (WULFSBERG, et al 1989; LUKUSA, et al 2002), 2 plagiocefalias (SHAPIRO, et al 1985; LEONARD, et al 1999) e 9 escafocefalias (MEHTA, et al 1987; BRUNISKY, et al, 1986; CHUNG, et al 1998; SHAPIRO, et al 1985; KOGASAKA, et al, 1990; BOROVNIK, 1991; TEYSSIER, et al 1992; LUKUSA, et al, 2000). Esta comparação tem sérias limitações, uma vez que a metodologia usada para a análise entre os casos é bastante variada sendo a maioria baseada em análise citogenética convencional e em apenas três casos a extensão da deleção foi definida por análise molecular (*aCGH* e *microarray*) em 7 casos (YATSENKO et al, 2009; MINHAS et al, 2012; CHEN et al, 2005). Apesar da dificuldade de interpretação das técnicas utilizadas, observa-se que a região deficiente da paciente 1, que é intersticial, se sobrepõe a dos outros pacientes com craniossinostose e deleção 10q terminal. O que nos leva a questionar se outros pacientes não foram erroneamente classificados como terminais devido a ausência de tecnologias de maior resolução.

O principal gene da região que pode explicar a craniossinostose é o *FGFR2* que faz parte da família de genes dos *Fibroblast growth factors* (*FGFs*), os quais são moléculas sinalizadoras mediadoras de processos de proliferação, migração e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário e no organismo adulto. Atuam através de ligação e ativação de quatro receptores de tirosina quinase (RTKs) denominados *Fibroblast Growth Factor Receptors* (*FGFRs*) (1-4). Mutações em heterozigose nos *FGFR1-3* têm sido associadas com diferentes doenças dominantes, dentre as quais podemos destacar várias síndromes de craniossinostose: síndrome de Crouzon, síndrome de Pfeiffer, sinostose isolada coronal, síndrome de Apert, síndrome de Jackson-Weiss, síndrome cutis gyrata Beare-Stevenson, inclusive escafocefalia familiar (LATTANZI, et al, 2012; PASSOS-BUENO et al, 2007; MCGILIVRAY et al, 2005). Mutações em *FGFR2* são responsáveis por aproximadamente 90% das craniossinostoses síndrômicas. Até o momento, apenas 10 casos (incluindo o paciente 1) de deleção em 10q26 apresentaram escafocefalia, sendo 9 terminais e apenas a nossa intersticial. Embora, deleções de *FGFR2* ainda não foram associadas com craniossinostose não podemos descartá-lo como um dos genes causadores da craniossinostose nessa

paciente. Dessa forma, é possível que a haploinsuficiência de *FGFR2* seja compensada por um estímulo excessivo de formação óssea desencadeado por outra molécula, mimetizando um ganho de função, ou ainda que sejam necessários eventos mutacionais adicionais em outros genes, levando à baixa penetrância e explicaria porque os outros casos de deleção nessa região não apresentam craniossinostose.

Outro gene deletado, que pode estar contribuindo para o fenótipo de craniossinostose é o *PTPRE*, envolvido na formação e diferenciação dos osteoblastos. Sabe-se que a fosforilação da tirosina desempenha um importante papel na regulação e no metabolismo ósseo, e a desregulação do equilíbrio fosfatase-quinase pode resultar em anomalias no sistema ósseo. Ratos *knockout* para o *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase* (Src) (produto gênico do *PTPRE*) ou em que o Src foi inibido farmacologicamente são osteopetróticos devido a redução da função dos osteoclastos, as células que degradam o osso. Estudos demonstraram que *PTPRE* é um regulador positivo da atividade dos osteoclastos *in vivo* (CHIUSAROLI, et al 2003) e por essa razão também pode ser considerado um bom candidato para a ossificação prematura das suturas cranianas.

É importante ressaltar que a região deletada possui genes homeobox, uma família de genes importantes no desenvolvimento embrionário, são eles o *VENTX*, *NKX1-2*, *NKX-6.2*, *HMX-2* e *HMX-3*. *VENTX* é uma proteína homeobox que funciona como regulador negativo da proliferação celular (SCERBO, et al 2012). A super expressão de *VENTX* em embriões de Zebrafish leva ao truncamento anterior e falha na formação da notocorda, características típicas da ventralização (MORETTI et al, 2001). Os genes *HMX-2*, *HMX-3* e *NKX-2.1* têm um papel chave na morfogênese dos componentes vestibulares do ouvido interno, e também são expressos no desenvolvimento do sistema nervoso central, incluindo o tubo neural e hipotálamo (WANG, 1998; WANG, et al 2004). O *HMX-2* estimula o *FGF-8* que promove o crescimento das vesículas telencefálicas, essenciais na neurogênese (MILLER, et al 2009). Através de moléculas supressoras, como *NKX-2.1*, o *FGF-8* inicia a ventralização do telencéfalo. O *NKX6.2* está envolvido na formação mesencéfalo por ativação da sinalização *Wnt* (MA et al 2013). A falta de um alelo desses cinco genes



homeobox chama a atenção para essa região como candidata a provocar as anomalias craniofaciais, como craniossinostose e também as outras AC observadas na paciente 1.

O paciente 2 apresentou uma deleção intersticial de cerca de 1,5 Mb no braço longo do cromossomo 1, na região q21.1 compreendendo 29 genes RefSeq, e 14 genes presentes no OMIM (Tabela 3).

Algumas pessoas portadoras da síndrome da microdeleção do 1q21.1 não possuem fenótipo observável enquanto outros possuem características variáveis que podem incluir cabeça pequena, atraso psicomotor, deficiência intelectual, anomalias craniofaciais e anomalias nos olhos. Outros achados podem incluir epilepsia, anomalias no coração, esqueleto e sistema urinário, além de doenças psiquiátricas e do comportamento incluindo esquizofrenia, desordem do espectro autista, déficit de atenção e hiperatividade, além de distúrbios do sono (MEFFORD et al, 2008; BRUNETTI-PIERRI et al 2008). Essa síndrome caracterizada por uma deleção de 1,35 Mb em uma região específica do 1q21.1 é distinta da região deletada que causa a Síndrome TAR, a qual é caracterizada por trombocitopenia e ausência de rádio devido à perda do gene *Rna Binding Motif Protein 8A (RBM8A)*, um dos quatro componentes do complexo de junção dos exons (spliceossomo), responsável por funções celulares básicas como exportação nuclear, localização subcelular de transcritos específicos e reforço de tradução. A gravidade das anomalias esqueléticas na TAR pode variar. Papoulidis, et al (2014) descreveram um caso de síndrome TAR com microcefalia. Apesar da deleção do paciente 2 se sobrepor tanto à região da TAR quanto da síndrome de 1q21.1, ele não apresenta agenesia radial, principal característica da síndrome TAR. Até o momento, não há relato de pacientes com deleção nessa região e craniossinostose. No entanto, Brunetti-Pierri et al. (2008) analisaram 21 casos com microdeleção em 1q21.1, sendo dois com craniossinostose (trigonocefalia e plagiocefalia), sugeriram que o *HYDIN2*, presente nessa região, é dosagem-sensível e sua monossomia é a causa da microcefalia vista nos pacientes. Mefford et al (2008) analisaram 5218 pacientes afetados por deficiência mental, autismo e/ou AC de causa desconhecida e 4737 controles. Dentre o afetados encontraram 25 pessoas com deleção de 1,35 Mb em 1q21.1 e

entre controles nenhum possuía essa deleção. Os estudos realizados por Mefford et al, (2008) e Brunetti-pierri et al (2008) demonstraram que mais de 75% dos pacientes com deleção em 1q21.1 apresentam atraso no desenvolvimento e 50-75% possuem microcefalia. Esses dados sugerem que essa região está constantemente envolvida em malformações craniais e devido ao fato da microcefalia ser causa de alguns casos de craniossinostose devemos considerá-lo um importante candidato.

Bond e Woods (2005) revisaram genes do citoesqueleto que são reguladores do tamanho do cérebro durante a evolução e destacaram o gene *PDE4DIP*, ortólogo das proteínas centrossominais (*Cnn*), que quando ausentes em *Drosófilas* provocam a redução do número neurônios, e homólogo do *Cdk5 Regulatory Subunit-Associated Protein 2* (*CDK5RAP2*), importante regulador da produção dos microtúbulos centrossomais e regulador negativo das proteínas quinase CDK5, responsáveis pela neurogênese, migração neuronal e neurodegeneração. Esse gene, bem como os genes *Microtubule-associated protein* (*ASPM*) e *γ tubulin ring and the centrosome* (*CENPJ*) são determinantes do tamanho do cérebro. Todos esses são importantes para organização microtubular do centrossoma e quando mutados causam microcefalia. Por esta razão, o *PDE4DIP* foi considerado um bom candidato. É possível que, nesse paciente, a microcefalia seja o defeito primário.

As duas quebras ocorreram em genes da família *Neuroblastoma Breakpoint Family* (*NBPF*), *NBPF8* e *NBPF10*, para a qual há poucas informações disponíveis. Alguns relatos associam essa região com várias doenças do desenvolvimento, tais como microcefalia e macrocefalia, autismo, esquizofrenia, deficiência intelectual, neuroblastoma e AC dos rins e do trato urinário (OMIM, 2014). VANDEPOELE et al, 2005 descreveram que genes dessa família sofreram aumento em seu número de cópias durante a evolução dos primatas. Esse aumento expressivo pode ser um importante causador do *crossing over* desigual corroborando com as quebras nessa região. Não podemos descartar a possibilidade que a quebra desses genes e a posterior formação de genes de fusão levem a craniossinostose e sejam a causa da agenesia renal presente nesse paciente.

O gene *HFE2* é o principal gene causador de hemocromatose, uma doença caracterizada por sobrecarga de ferro no organismo, resultando em deposição de ferro nos tecidos e disfunção dos órgãos, associada com osteopenia e osteoporose. Esse gene participa da sinalização das *BMP's*, principalmente o *bone morphogenetic protein 6 (BMP6)*. As *BMP's* são proteínas responsáveis pela formação do osso endocondral (cartilagem). Mutações em *HFE2* levam a diminuição da sinalização dos *BMPs* e posterior deficiência na regulação do transporte e armazenamento de ferro (MAEGDEFRAU et al 2001; BABITT e LIN, 2011). Há evidências que o excesso de ferro inibe a osteogênese, por inibição do metabolismo (diferenciação e proliferação) dos osteoblastos e diminuição da mineralização, provocando osteoporose (YAMASAKI e HAGIWARA, 2009). É possível que a perda de um alelo de *HFE2* esteja contribuindo com alterações no balanço das vias de manutenção e formação óssea, e, conseqüentemente, com o fenótipo de craniossinostose.

Analisando a região deletada no DECIPHER são encontrados vários pacientes com perdas dessa mesma região associadas com microcefalia, plagiocefalia e outras anomalias ósseas, além de anomalias faciais, genitais, do sistema neural, dentre outras. Devido ao grande número de pacientes nesse banco de dados e a heterogeneidade das descrições clínicas, restringindo o tamanho da região para busca de genes, selecionando 3 pacientes que possuíam perda de parte ou toda região 1:145,479,218-145,693,383 associada a anomalias craniofaciais e/ou nos ossos dos membros. Essas deleções envolveram os seguintes genes RefSeq: *NBPF10*, *Lix1 Homolog (Mouse)-Like (LIX1L)*, *RBM8A*, *Putative Gonadotropin-Releasing Hormone II (GNRHR2)*, *Peroxisomal Membrane Protein 11B (PEX11B)*, *Integrin Alpha-10 (ITGA10)*, *Ankyrin Repeat Domain 35 (ANKRD35)*, *PIAS3*, *Nucleoside Diphosphate Linked Moiety X-Type Motif 17 (NUDT17)*, *Polymerase (RNA) III (DNA Directed) Polypeptide C (POLR3C)* e *Ring Finger Protein 115 (RNF115)*. Uma extensa pesquisa na literatura foi realizada a fim de encontrar associações entre esses genes e o fenótipo de craniossinostose, porém poucos possuem informações e estudos funcionais relevantes. Destacamos o gene *PIAS3* como outro possível candidato da craniossinostose, pois é um importante inibidor das proteínas *Transducer and Activator of Transcription*, ou também *Signal Transduction And transcription (STATs)*, as quais ativam a transcrição em resposta

a diversas citocinas, controlando a proliferação celular, a expressão de genes e a apoptose. O *PIAS3* é um modulador da osteoclastogênese e há evidências recentes que sugerem que ele regula vários genes importantes para o balanço entre osteoclastogênese e osteoblastogênese, tais como *MSX2*, *TWIST1* e *Src* (HIKATA, et al 2009; KIM, et al 2007; LEVY et al 2003; QIN et al, 2012), sendo os dois primeiros genes causadores de craniossinostose e o último um dos genes propostos nesse trabalho.

A deleção observada no paciente 3 possui aproximadamente 0,6 Mb e engloba três genes presentes no OMIM: *PTPN20B*, *GDF2* e *GDF10* e. O primeiro, pertence à família das proteínas tirosina fosfatases, que regulam processos celulares fundamentais, tais como crescimento, proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular (RefSeq, 2008; GeneCards, 2014). Embora presente no OMIM, esse é pouco estudado. Sendo assim, apenas os genes *GDF10* e *GDF2* foram considerados candidatos para craniossinostose, pois são fatores de crescimento e diferenciação celular que pertencem à família dos *BMP's*.

O *GDF10*, também chamado de *BMP3b*, junto com o *BMP3* representa um subgrupo único da família dos *BMP's*. Foi isolado em tecidos do fêmur de rato (CUNNINGHAM, et al 1995), mas também é expresso em outros tecidos (HINO, et al 1999; TAKAO, et al 1996). Estudos recentes demonstraram que *BMP3b* inibe a diferenciação dos osteoblastos, provavelmente por antagonismo ao *BMP2*, um dos principais fatores osteogênicos conhecidos, uma vez que compete com a viabilidade das proteínas *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4* (*SMAD4*) (MATSUMOTO, et al 2012; HIJO, et al 2004) que são co-ativadores e mediadores da transdução de sinal pelos *Transforming Growth Factor* ( $TGF-\beta$ ). *SMAD4* e  $TGF-\beta$  participam juntos do desenvolvimento da cartilagem, membrana endocondral e óssea e pele (DICKINSON et al 1990). *BMP-3b*, também é importante nos processos de desenvolvimento e embriogênese, pois atua como um fator dorsalizante. Desencadeia a formação secundária da cabeça de *Xenopus* de maneira autônoma e antagoniza as proteínas *nodal-like* [*Exoribonuclease 1* (*XNR10*) e *growth differentiation factor 3* (*GDF3*)] e *BMPs* ventralizadoras, necessárias para o desenvolvimento posterior de *Xenopus* (MATSUMOTO, et al 2012; HIJO, et al 2003).

Além disso, Tandon, et al (2012) demonstraram que o *BMP-3b* é alvo do gene *RUNX2*, essencial para o desenvolvimento ósseo e quando mutado causa craniossinostose (NACAMULI et al 2003; RICE et al 2003).

*GDF2*, também chamado de *BMP-9*, foi identificado no fígado de camundongos e, dentre os 14 tipos de *BMP*, é o mais potente na indução de diferenciação osteogênica em células tronco mesenquimais por meio da regulação de vários importantes alvos *downstream*, Interage com diversas vias de sinalização envolvidas na formação do osso, como a *Wnt/β-catenina*, *Insulin-Like Growth Factor (IGF)*, *Epidermal Growth Factor (EGF)*, *Elk-Related Tyrosine Kinase (ERK)* e retinóide (NING HU, et al 2013).

Vários estudos têm demonstrado que o *BMP-9* é um agente efetivo de regeneração óssea. (WANG, et al 2013; LUTHER, et al 2011). Curiosamente, Luu et al (2006) estudaram as diferentes funções dos *BMPs* na diferenciação osteogênica e como esses *BMPs* osteogênicos eram afetados pelo *BMP3*, um dos antagonistas da formação óssea. Para isso, eles co-injetaram diferentes *BMPs* com o *BMP3* em uma mesma cultura celular. A diferenciação óssea de todos os *BMPs* foi inibida pela presença do *BMP-3*, com exceção do *BMP-9*, sugerindo fortemente que o *BMP-9* pode transduzir uma via de sinalização que embora seja sobreposta, é distinta de outros *BMPs*. Esses achados são bastante interessantes, pois mesmo perdendo um alelo de um forte indutor e regulador das vias de osteogênese observa-se a fusão prematura da sutura. A monossomia simultânea de um fator indutor e um forte antagonista da ossificação pode ter provocado a desregulação das vias de sinalização osteogênicas e resultado em fusão prematura da sutura.

Análise da região deletada no paciente 3 no DGV não demonstrou um número significativo de indivíduos controle com a mesma alteração para que seja excluída a relevância dos genes deletados na craniossinostose. No DECIPHER, 17 outros casos de deleção da mesma região foram encontrados, sendo a maioria dos casos com deficiência intelectual. Destacamos casos que relataram malformações ósseas, tais como microcefalia, dedos cônicos, anormalidade do esmalte dental, desvio ulnar da mão, palma curta, contratura em flexão da mão, *pectus carinatum*, clinodactilia, e

um caso de hipocalcemia e hipoparatireoidismo, ambos relacionados com metabolismo ósseo, o que reforça que os genes *GDF2* e *GDF10* são críticos para o desenvolvimento ósseo. Em relação às outras características fenotípicas do paciente 3, outros relatos do DECIPHER corroboram que alterações nessa região também levam a anomalias genitais (criptoquidismo), malformações das orelhas e problemas oculares, tais como, opacificação do estroma corneal, blefarofimose e epicanto.

Diferentemente dos outros casos, o paciente 4 possui uma duplicação 0,45 Mb que engloba apenas O gene *CHRNA7*. O *CHRNA7* codifica a subunidade  $\alpha 7$  do receptor neuronal nicotínico acetilcolina, que forma canais de cálcio pentaméricos e localiza-se na região proximal do cromossomo 15 (15q11-q14), rica em repetições de pequenos números de cópias (*Low-copy repeats*, LCRs), as quais são regiões propensas a recorrentes microdeleções, microduplicações e inversões. Nessa região também está o gene de fusão *CHRNA7/FAM7A* (*Fusion Gene CHRFAM7A*) composto por uma cópia da porção 5' do exon 10 do *CHRNA7* fundido com uma cópia do gene *family with sequence similarity 7A* (*FAM7A*) e que é apenas encontrado em humanos, mas seu padrão de expressão e função são desconhecidos.

Embora as duplicações sejam, em geral, mais leves que as deleções, estudos de caracterização fenotípica de pacientes com microduplicação de *CHRNA7* revelaram um amplo espectro de déficit cognitivo e alterações neurocomportamentais incluindo deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, esquizofrenia, convulsões, depressão, transtorno bipolar, espectro autista, desordem de déficit de atenção e hiperatividade e desordem do comportamento agressivo (BEAL, 2013; WILLIAMS et al, 2013; SZAFRANSKI et al 2010).

Achados semelhantes foram encontrados na análise dessa região no DECIPHER que mostrou 30 outros casos de ganho que em sua maioria descrevem o fenótipo de desordens neurais, tais como lisencefalia, convulsões, deficiência intelectual, autismo e atraso no DNPM. Destacamos os casos que possuem anomalias ósseas, que incluem turricéfalia, microcefalia, braquidactilia, aracnodactilia, prognatismo, hallux amplo, dedos grandes e pés *equinovarus*. Também existem descrições de

outros fenótipos semelhantes ao nosso paciente, como o nariz bulboso, filtro e ponte nasal amplos. Por outro lado, o DGV apresenta 20 casos controle com ganho na mesma região, porém, ao analisarmos somente estudos independentes, esse número é reduzido para oito, o que ainda é número alto de ocorrência indicando que essa seja uma região polimórfica de CNV e que talvez não esteja relacionada ao fenótipo nesse paciente. Williams et al (2013) reforçam essa possibilidade em seus achados recentes.

Williams et al (2013) em seu estudo *genome-wide* encontraram microduplicações em 15q13.3 como fator de risco elevado para déficit de atenção e hiperatividade em crianças. Szafranski et al (2010) estudaram por aCGH o genoma de 8,832 pacientes com distúrbios no desenvolvimento e neuropsíquicas e encontraram microduplicação no 15q13 de diferentes tamanhos em 55. Dentre os estudos de famílias, todas as microduplicações foram herdadas. A partir disso, sugeriram que a seleção genética contra microduplicações dessa região é baixa. Porém, eles ressaltaram o fato de que a alta frequência de fenótipos leves neuropsiquiátricos e até abuso de álcool nos pais dos pacientes, é preocupante e indica que essas microduplicações possuem riscos fenotípicos. Esses mesmos autores descreveram que as microduplicações do *CHRNA7* possuem sete subtipos e que o fato dessas pequenas microduplicações também terem sido relatadas em pacientes controle, serem herdadas em todos os casos e frequentemente estarem associadas a CNVs (variações do número de cópias) de significância desconhecida sugere que algumas ou as cinco classes de microduplicações sejam completamente benignas. Alternativamente, os autores supõem que a presença de CNVs concomitantes nos pacientes estudados sugerem que a microduplicação do 15q13 possa ser semelhante a um efeito digênico (heterozigotos duplos) e cause um desequilíbrio da homeostase neuronal, predispondo a fenótipos neurodesenvolvimentais e neuropsiquiátricos influenciados pela presença ou ausência de outros modificadores genéticos. Esses modificadores genéticos podem incluir a soma do nível de expressão de todas as cópias de *CHRNA7*, o número de cópias, nível de expressão e função, se houver, do gene de fusão *CHRFAM7A*, outros modificadores monogênicos e a presença de CNVs concomitantes no mesmo paciente.

Por falta de estudos de função relacionando esse gene com a fisiopatologia da craniossinostose não podemos considerá-lo um bom candidato. Sugerimos que genes não RefSeq dessa região sejam investigados.

Embora exista muita controvérsia em relação a existência de patogenicidade ou não nas microduplicações do 15q13 e mesmo sabendo que os fenótipos relacionados a ganho sejam mais brandos que nas perdas, a inserção de uma cópia extra de um gene deve alterar a expressão de outros genes.

O paciente 5 possui uma deleção de 9,4 Mb no braço curto do cromossomo 2. A segunda quebra ocorreu na porção intrônica do gene *Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 954 (LINC00954)*, são transcritos não codificadores de proteínas que possuem menos de 200 nucleotídeos, característica que os difere de RNAs reguladores. Não existem relatos de deleção nesse gene, tampouco estudos funcionais. Além disso, há poucos relatos de deleção nessa região, conseqüentemente não há associações entre o genótipo e o fenótipo.

O paciente 5 apresenta microcefalia e anomalias nos membros, sinais compatíveis com a Síndrome de Feingold (OMIM #164280), um distúrbio autossômico dominante caracterizado por microcefalia, malformações dos membros, atresia do esôfago e duodeno e deficiência mental. Anomalias das mãos e pés podem incluir polegares hipoplásicos, clinodactilia dos 5º dedos, sindactilia nos dedos dos pés, e falanges médias encurtadas ou ausentes. Malformações renais e cardíacas, anomalias vertebrais, e surdez também tem sido descrita na minoria dos pacientes.

O OMIM relaciona o gene *V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral-Related Oncogene, Neuroblastoma-Derived (MYCN)* como principal responsável pela síndrome de Feingold. *MYCN* é um oncogene que codifica um fator de transcrição pertencente a família *V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (MYC)*. Ele é expresso principalmente em embriões normais em desenvolvimento e é crítico no desenvolvimento neural. Está amplificado em 20-30% dos neuroblastomas, que são os tumores extracraniais sólidos mais freqüentes na infância (TESZAS, et al 2006). A deficiência de *MYCN* em vários modelos resulta em atraso no desenvolvimento de



órgãos, que normalmente expressam altos níveis de *MYCN*, tais como coração, pulmão, e intestino. Camundongos com deficiência de *MYCN* apresentaram uma redução de duas vezes na massa cerebral, incluindo graves defeitos no cerebelo, o indicando como fator crucial durante o desenvolvimento do sistema nervoso (KOPECKY et al., 2011; WITTMANN, SCHIMMANG e GUNHAGA, 2013). Junto com o *MYCC*, outro gene dessa família, coordena a proliferação de células progenitoras responsáveis pela formação do esqueleto dos membros e regula *sex determining region Y-box 9* (*SOX9*) e *RUNX2* (ZHOU et al 2011): Embora não haja relatos associando *MYCN* a craniossinostose, como já mencionado, CNV em *RUNX2* causam craniossinostose. Ou seja, a ausência de um alelo de *MYCN* pode influenciar na expressão e proliferação de *RUNX2* explicando assim a craniossinostose encontrada no nosso paciente.

Outro gene interessante, *E2F transcription factor 6* (*E2F6*) pertence à família de proteínas *E2F* que participa da regulação da expressão de genes essenciais para ciclo celular. STORRE et al (2002) e COUREL et al (2008) descreveram que esse gene é importante no desenvolvimento do esqueleto axial pois sua deleção causa transformações homeóticas no esqueleto axial de camundongos.

Além do *E2F6*, o gene *Structural Maintenance Of Chromosomes 6* (*SMC6*) atua no reparo de DNA e juntamente com seu homólogo o gene *Maintenance Of Chromosomes Protein 5* (*SMC5*) impede a formação de junções nas cromátides irmãs, garantindo a divisão correta dos cromossomos na anáfase. O locus do gene *SMC5* foi associado com Síndrome de Kabuki, caracterizada por dismorfismos faciais, anomalias esqueléticas, baixa estatura, deficiência mental e craniossinostose, achado comum, mas geralmente subestimado nessa síndrome (KUNIBA et al 2009). Martínez-Lage et al (2010) e David et al (2004) associaram as características clínicas, e ressaltaram a semelhança entre a Síndrome de Kabuki e a Síndrome de Trigonocefalia de Opitz. O *SMC6* por ser um homólogo do *SMC5* quando deletado pode estar relacionado com a craniossinostose.

Outro gene presente na região que não pode ser excluído é o *LPIN1*, que codifica um regulador da atividade de *Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$*  (*PPAR $\gamma$* )

(KIM, et al 2013; JAMES, 2013), um dos principais fatores de transcrição na adipogênese e um candidato para síndrome de lipodistrofia. Há evidências que a diferenciação das células tronco mesenquimais em uma linhagem adipogênica reprime a expressão da linhagem osteogênica, e vice-versa (LEVI et al.,2010; LEVI et al., 2011). Hipotetizamos que a haploinsuficiência do fator de indução da adipogênese pode ter induzido a osteogênese, levando ao fechamento prematuro da sutura.

No DECIPHER, foram encontrados outros seis pacientes com deleção nessa região, porém de menor tamanho e em nenhum deles foi descrita craniossinostose. Todavia, foram descritas algumas anomalias ósseas e crâniofaciais, que incluem microcefalia, micrognatia, clinodactilia do 5º dedo, síndrome de braquidactilia e macrodontia. Por outro lado, trigonocefalia e microcefalia foram observadas em um caso com ganho nessa região.

Deleções no braço curto do cromossomo 2 são raras e existem poucos casos reportados na literatura. Saal et al (1996) reportaram um caso de deleção 2p24.2-p25.1 que apresentava baixa estatura, face retangular, microcefalia, hipotonia, deficiência mental e perda auditiva. Su et al (2011) reportaram um caso de deleção em 2p23-p24 detectada por aCGH que apresenta deficiência intelectual moderada, perda auditiva sensorineural, sinostose rádio ulnar, e anomalia craniofacial. Compararam os resultados de outros oito casos de deleção no 2p com pontos de quebra entre p16-p25 e como esperado, as anomalias presentes nos outros casos são diferentes do caso reportado por eles. Contudo, alguns achados comuns, tais como anomalias musculoesqueléticas, craniofaciais, dos pés e das mãos e hipotonia estavam presentes.

Estudos citogenéticos realizados por Jehee et al (2008) em 45 indivíduos com craniossinostose síndrômica mostraram que 20% dos casos estão associados à anomalia cromossômica. Com a utilização de técnicas moleculares tais como aCGH e MLPA para a investigação de alterações submicroscópicas e análise de segregação de polimorfismos microssatélites, a frequência aumentou consideravelmente, passando para 42%. No entanto, Wilkie et al, (2010) estudaram

30 pacientes com craniossinostose sindrômica sem causa genética conhecida e identificaram microdeleções relevantes para a clínica em apenas 6,7% dos pacientes. Mefford et al (2010) avaliaram 168 indivíduos com craniossinostose de sutura única e encontraram em 7,5% CNV raras. Mesmo que diferentes esses resultados demonstraram que rearranjos submicroscópicos são importante causa de craniossinostose.

A análise de alterações estruturais >1 Mb e posterior seleção de genes candidatos, nos pacientes 1, 2 e 5, foram mais complexas devido a quantidade de genes na sua região. Porém nos casos <1 Mb, nos pacientes 3 e 4, a seleção de genes candidatos foi fundamental e bastante interessante, pelo fato de existirem poucos genes envolvidos e assim mais facilidade associá-los ao fenótipo. Entretanto, nesse ultimo caso o maior desafio é estabelecer se a alteração é benigna ou patogênica.

Em geral, a perda e/ou quebra de um gene e sua posterior fusão a uma porção gênica desconhecida pode contribuir para alteração da expressão do próprio gene interrompido e também de outros localizados próximos a quebra e a fusão. Ademais, a haploinsuficiência de um gene e posteriormente de uma proteína por ele codificada pode causar super expressão ou baixa expressão de seus respectivos alvos, alterando conseqüentemente suas funções.

A heterogeneidade fenotípica entre pacientes com deleções e duplicações semelhantes pode ser resultado das dificuldades de identificação e exata localização dos segmentos deletados e duplicados na era pré *array*. Na maioria dos casos, os achados citogenéticos são suscetíveis a falhas na interpretação.

Atualmente, as análises por bioinformática são o principal desafio na interpretação de dados genômicos. Durante o estudo, a etapa mais complexa foi compreensão dos bancos dados, e principalmente a compatibilidade dos resultados nos diferentes bancos e em suas diferentes versões, isto é, em um banco a deleção ocorreu em um gene e em outro banco, a mesma região deletada não quebra nenhum gene.

As diferentes de alterações estruturais encontradas e sua localização em diferentes regiões do genoma humano reforçam a heterogeneidade genética na craniossinostose e demonstra, a complexidade do desenvolvimento das suturas, que dependem de muitos genes e a importância da análise de aCGH em pacientes com craniossinostose sindrômica que foram excluídos para qualquer das formas monogênicas conhecidas. A realização de estudos de função dos genes envolvidos nas principais vias de formação óssea é necessária para explicar como as deleções podem causar ao fechamento prematuro da sutura.

## 6 CONCLUSÃO

Muitos pacientes com craniossinostose não apresentam mutações nos genes conhecidos e continuam sem diagnóstico. Além de contribuir para o diagnóstico dos pacientes estudados, a utilização de aCGH possibilitou a pesquisa de alterações estruturais em alta resolução e identificação de regiões genômicas e potenciais genes envolvidos nas principais vias de ossificação em dois tipos diferentes de craniossinostose. A principal relevância desse trabalho é que esses genes podem vir a explicar a craniossinostose em outros pacientes.

## 7 REFERÊNCIAS

ARDALAN, M. et al. Risk Factors Associated with Craniosynostosis: A Case Control Study. **Pediatr Neurosurg**, v. 48, p. 152–156, 2012.

BABITT, J.L. e LIN, H.Y. The molecular pathogenesis of hereditary hemochromatosis. **Semin Liver Dis**, n. 3, v. 31, p. 280-292, 2011.

BACHRACH, U. Metabolism And Function Of Spermine And Related Polyamines. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 24, p.109-134, 1970.

BEAL, J. C. Neuronal Migration Disorder Associated With Chromosome 15q13.3 Duplication in a Boy With Autism and Seizures. **J Child Neurol**, 2013.

BOROVIK, C.L. Terminal Deletion of Chromosome 10q26 due to a Paternal Translocation {(7;10)(q36;q26)}. **American Journal of Medical Genetics**, n. 41, p.534-536, 1991.

BRUSNICK, J. et al. Severe mental retardation in six generations of a large South African family carrying a translocation t(6;10)(q27;q252). **Journal of Medical Genetics**, n. 23,p. 435-445, 1986.

BRUNETTI-PIERRI, N. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. **Nature Genet**, v. 40, p. 1466-1471, 2008.

BOND, J., e WOODS, C.G. Cytoskeletal genes regulating brain size. **Curr Opin Cell Biol**, v. 18,v. 1, p. 95-101, 2006.

CHO E.H., et al. Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification vs Fluorescent In Situ Hybridization. **Korean J Lab Med**, v.29, n.1, p.71-76, 2009.

CHEN, C.P. et al. Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic analysis of partial monosomy 10q (10q25.3→qter) and partial trisomy 18q (18q23→qter) in a fetus associated with cystic hygroma and ambiguous genitalia. **Prenat Diagn**, n. 25, p. 492–496, 2005.

CHIUSAROLI R. et al. Tyrosine Phosphatase Epsilon Is a Positive Regulator of Osteoclast Function in Vitro and In Vivo. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 234–244, 2004.

CHUNG, YI-PEI. et al. Prenatal diagnosis of monosomy 10q25 associated with single umbilical artery and sex reversal: report of a case. **Prenatal diagnosis**, n. 18, v. 1, p. 73–77, 1998.

COHEN, M.M. Jr. Perspectives on craniosynostosis. (Editorial Review). **West J Med**, v. 132, p.507-513, Jun. 1980.

COHEN, M.M. Jr. Sutural Biology and the Correlates of Craniosynostosis. **American Journal of Medical Genetics**, v. 47, p.581-616, 1993.

COHEN, M.M. e MACLEAN, R.E. **Craniosynostosis**: diagnosis, evaluation, and management. 2. ed. New York ; Oxford : Oxford University Press, 2000.

COUSSENS, A.K. et al. Identification of genes differentially expressed by rematurely fused human sutures using a novel in vivo –in vitro approach. **Differentiation**, v. 76, p. 531–545, 2008.

COUNTERS, W. et al. A Subterminal Deletion of the Long Arm of Chromosome 10:A Clinical Report and Review. **American Journal of Medical Genetics**, v.140A, p. 402–409, 2006.

COUREL M, et al. E2f6 and Bmi1 cooperate in axial skeletal development. **Dev Dyn**, n.5, v. 237, p.1232-1242, 2008.

CUNNINGHAM, N. S. et al.Growth/differentiation factor-10: a new member of the transforming growth factor-beta superfamily related to bone morphogenetic protein-3.**Growth Factors**, n. 12, p. 99-109, 1995.

CZEIZEL, A.E. Birth Defects Are Preventable. **Int J Med Sci**, v.2, n. 3, p. 91-92, 2005

DAVID, G. A case of Kabuki (Niikawa-Kurobi) syndrome associated with manifestations resembling C-trigonocephaly syndrome. **Am J Med Genet A.**, n.4, v. 130A, p.389-392, 2004.

DICKINSON, M. E., et al. Chromosomal localization of seven members of the murine TGF-beta superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci. **Genomics**, v. 6, p. 505-520, 1990.

DIEGO-ALVAREZ, D., et al. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. **Prenat. Diagn.**, v. 27, n. 8, p. 765-771, 2007.

DONAGHUE, C. et al. Combined QF-PCR and MLPA molecular analysis of miscarriage products: an efficient and robust alternative to karyotype analysis. **Prenat Diagn.**, v. 30, n. 2, p. 133-137, 2010.

EDELMANN, L. HIRSCHHORN, K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associates with mental retardation and multiple congenital anomalies. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1151, p. 157-66, 2009.

FATORRE, D.F., TETI, A., RUCCI, N. Bone cells and the mechanisms of bone remodeling. **Frontiers in Bioscience E4**, p. 2302-2321, 2012.

FEUK, L., CARSON A.R., SCHERER S.W. Structural variation in the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 85-97, 2006.

FIRTH, H.V. et al. Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources, DECIPHER. **Am.J.Hum.Genet.**, n. 84, p. 524-533, 2009.

FONSECA, A.C.S. **Caracterização de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados a quadros clínicos**. 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GAO, J. et al. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion. **Molecular Cytogenetics**, v.5, p.33, 2012.

GUILHERME, R.S. et al. Ring chromosome 10: report on two patients and review of the literature. **J Appl Genetics**, v. 54, p. 35–41, 2013.

GORINATI, M. et al. Terminal Deletion of the Long Arm of Chromosome 10: Case Report and Review of the Literature. **American Journal of Medical Genetics**, v.33, p.502-504, 1989.

HIKATA, T. et al. PIAS3 negatively regulates RANKL-mediated osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblasts. **Blood**, v.10, n.113, p. 2202-2212, 2009.

HINO, J., et al. Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) gene expression is correlated with differentiation in rat calvarial osteoblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 256, p. 419–424, 1999.

HINO, J., et al. Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions. **Frontiers in Bioscience** v. 9, p. 1520–1529, 2004.

HINO, J., et al. Coordination of BMP-3b and cerberus is required for head formation of *Xenopus* embryos. **Developmental Biology**, v. 260, p. 138–157, 2003.

HOROVITZ, D. D. G. et al. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. **Cad. Saúde Pública** [online], v.21, n.4, p. 1055-1064, 2005.

HU, N., et al. Inhibition of histone deacetylases potentiates BMP9-induced osteogenic signaling in mouse mesenchymal stem cells. **Cell Physiol Biochem**, n. 2, v. 32, p. 486-498, 2013.

IOUROV, Y.I. et al. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies. **Molecular Cytogenetics**, v. 5, p. 46, 2012.

IRVING, M. et al. Deletion of the Distal Long Arm of Chromosome 10; Is There a Characteristic Phenotype? A Report of 15 De Novo and Familial Cases. **American Journal of Medical Genetics**, v. 123A, p.153–163, 2003.

IZZO, G. et al. A microduplication of 5p15.33 reveals CLPTM1L as a candidate gene



for cleft lip and palate. **European Journal of Medical Genetics**, v. 56, p. 222-225, 2013.

JAMES, A.W., et al. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. **Scientifica**, 2013.

JEHEE, F.S. et al. High frequency of submicroscopic chromosomal imbalances in patients with syndromic craniosynostosis detected by a combined approach of microsatellite segregation analysis, multiplex ligation-dependent probe amplification and array based comparative genome hybridization. **J Med Genet.**, v. 45, p. 447–450, 2008.

JOHNSON, D. et al. A novel mutation, Ala315Ser, in FGFR2: a gene-environment interaction leading to craniosynostosis? **Eur J Hum Genet**, v. 8, n.8, p. 571-7, Aug. 2000.

JOHNSON, D. et al. A comprehensive screen of genes implicated in craniosynostosis. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 85, n. 6, p. 371–377, 2003.

KÄLLÉN B. e ROBERT-GNANSIA E. Maternal drug use, fertility problems, and infant craniostenosis. **Cleft Palate Craniofac J.** v. 42, n. 6, p. 589-93, Nov. 2005

KALLIONIEMI, A., et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science**, v.258, p.818-821, 1992.

KALTER H & WARKANY J. Congenital malformations: etiological factors and their role in prevention (first of two parts). **New England Journal of Medicine**, n. 308, p. 424-431, 1983.

KEARNEY, H.M. et al. American College of Medical Genetics standarts and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. **Genetics in Medicine**, v.13, p.680-685, 2011.

KEHRER-SAWATZKI, H. et al. Interstitial deletion del(10)(q25.2q25.3~26.11)-case report and review of the literature. **Prenatal Diagnosis**, v. 25, p. 954–959, 2005.

KENT, W.J., et al. The human genome browser at UCSC. **Genome Res.**, n.6, v. 12, p. 996-1006, 2002.

KOGASAKA, M.D. et al. Terminal Deletion of Chromosome 10q and Its Clinical Features. **Acta Paediatr**, n. 32, p. 83-87, 1990.

KOPECKY, B., et al. Conditional deletion of N-Myc disrupts neurosensory and non-sensory development of the ear. **Dev Dyn**, v. 240, p.1373–1390, 2011.

KOZLOWSKI P, JASINSKA AJ, KWIATKOWSKI DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. **Electrophoresis**, v. 29, n. 23, p. 4627-4636, 2008.

KIM, H.E., et al. Lipin1 regulates PPAR $\gamma$  transcriptional activity. **Biochem J.**, n. 1, v. 453, p. 49-60, 2013.

KIM K., et al. Protein inhibitor of activated STAT 3 modulates osteoclastogenesis by down-regulation of NFATc1 and osteoclast-associated receptor. **J Immunol**, v. 9, n. 178, p. 5588-5594, 2007.

KIM, S.D. et al. Leucine-rich repeat, immunoglobulin-like and transmembrane domain 3 (LRIT3) is a modulator of FGFR1. **FEBS Lett**, v. 586, p.1516–1521, 2012.

KUNIBA H., et al. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. **J Hum Genet**, n. 5, v. 54, p. 304-309, 2009.

LATTANZI, W. et al. Genetic basis of single-suture synostoses: genes, chromosomes and clinical implications. **Childs Nerv Syst**, v. 28, p. 1301–1310, 2012.

LEE C., lafrate A.J., Brothman A.R. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. **Nat Genet**, v.39, p. S48-S54, 2007.

LEE, C. et al. Clinical utility of array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: a cohort study of 3171 pregnancies. **BJOG**, v.119, p. 614–625, 2012.

LEONARD, N.J., HARLEY, F.L. e LIN, C.C. Terminal Deletion of Chromosome 10q at Band 26.1: Follow-Up in an Adolescent Male With High-Output Renal Failure From Congenital Obstructive Uropathy. **American Journal of Medical Genetics**, v. 86, p.115–117, 1999.

LENISK OBERSTEIN S.A., et al. Peter Plus syndrome is caused by mutations in B3GALT1, a putative glycosyltransferase. **Am J Hum Genet**. v. 79, p.562-566, 2006.

LEVI, B., Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. **PLoS ONE**, n. 6, v. 5, 2010.

LEVI, B. e LONGAKER, M. T. Concise review: adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine, **Stem Cells**, n. 4, v. 29, p. 576–582, 2011.

LEVY, C. et al. A new role for the STAT3 inhibitor, **PIAS3**: a repressor of microphthalmia transcription factor. **J. Biol. Chem**, n. 277, p. 1962-1966, 2002.

LEWANDOVSKI, R.C. et al. Partial deletion 10q. **Human Genetics**, v.42, p.339-343, 1978.

LUPSKI J.R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. **Trends in Genet**, v. 14, n. 10, p. 417-422, 1998.

LUKUSA T. e FRYNS J.P. Pure distal monosomy 10q26 in a patient displaying clinical features of Prader-Willi syndrome during infancy and distinct behavioural phenotype in adolescence. **Genet Couns**, v. 2, n. 11, p. 119-126, 2000.

LUKUSA, T. et al 2002. Small terminal 10q26 deletion in a male patient with Noonan-like stigmata: diagnosis by cytogenetic and FISH analysis. **Genet Couns**, n.4, v.13, p.417-425, 2002.

LUTHARDT, F. W. e KEITGES, E. Chromosomal Syndromes and Genetic Disease. **Encyclopedia of life sciences**, 2001.

LUTHER, G. BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: molecular mechanism and therapeutic potential. **Curr Gene Ther**, n.3, v.11, p. 229-240, 2011.

LUU, H. H. Distinct Roles of Bone Morphogenetic Proteins in Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Journal Of Orthopaedic Research**, n. 5, v. 25, p. 665-677, 2007.

MA P. et al. Xenopus Nkx6.1 and Nkx6.2 are required for mid-hindbrain boundary development. **Dev Genes Evol**, n.4, v. 223, p. 253-259, 2013.

MACDONALD, J.R., et al. The database of genomic variants: a curated collection of structural variation in human genome. **Nucleic Acid Res.**, 2013.

MAEGDEFRAU, U., et al. Downregulation of hemojuvelin prevents inhibitory effects of bone morphogenetic proteins on iron metabolism in hepatocellular carcinoma. **Laboratory Investigation**, v. 91, p. 1615–1623, 2011.

MARTÍNEZ-LAGE, J.F. et al. Craniosynostosis in Kabuki syndrome. **J Neurosurg Pediatr**, n. 2, v. 6, p.198-201, 2010.

MCCANDLESS, S.E. et al. Adult With an Interstitial Deletion of Chromosome 10 [del(10)(q25.1q25.3)]: Overlap With Coffin-Lowry Syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v.95, p.93-98, 2000.

McGILLIVRAY, G., et al. Familial scaphocephaly syndrome caused by a novel mutation in the FGFR2 tyrosine kinase domain. **J. Med. Genet**, v. 42, p.656-662, 2005.

MEFFORD, H. C., et al. Recurrent Rearrangements of Chromosome 1q21.1 and Variable Pediatric Phenotypes. **N Engl J Med**, v. 359, p. 1685-1699, 2008.

MEFFORD, H.C. et al. Copy number variation analysis in single-suture craniosynostosis: multiple rare variants including RUNX2 duplication in two cousins with metopic craniosynostosis. **Am. J. Med. Genet. A** v. 152A, p. 2203–2210, 2010.

MEHTA, L., DUCKETT, D. P. e YOUNG, I. D. Behaviour disorder in monosomy 10qter. **Journal of Medical Genetics**, n. 24, p. 185-187, 1987.

MELVILLE, H. et al. Genetic basis of potential therapeutic strategies for craniosynostosis. **Am. J. Med. Genet. A**, v.152a, p. 3007–3015, 2010.

MERKS, J.H.M. et al. Phenotypic abnormalities: terminology and Classification. **Am. J. Med. Genet.**, v. 123A, p. 211-230, 2003.

MERRILL, A.E. et al. Cell mixing at a neural crest-mesoderm boundary and deficient ephrin-Eph signaling in the pathogenesis of craniosynostosis. **Hum. Mol. Genet.** v. 15, p. 1319–1328, 2006.

MILLER N.D., et al. Molecular (SNP) analyses of overlapping hemizygous deletions of 10q25.3 to 10qter in four patients: Evidence for HMX2 and HMX3 as candidate genes in hearing and vestibular function. **Am J Med Genet Part A**, n. 149A, p. 669–680, 2009.

MINHAS, H.M. et al. An unbalanced translocation involving loss of 10q26.2 and gain of 11q25 in a pedigree with autism spectrum disorder and cerebellar juvenile pilocytic astrocytoma. **Am J Med Genet Part A**, n. 161A, p. 787–791, 2013.

MINOIS, N. Molecular Basis of the 'Anti-Aging' Effect of Spermidine and Other Natural Polyamines - A Mini-Review. **Gerontology**, 2014.

MOSS, M.L. The pathogenesis of premature cranial synostosis in man. **Acta Anat**, v.37, p. 351, 1959.

MORETTI P.A., et al. Molecular cloning of a human Vent-like homeobox gene. **Genomics**, n.76, v.1-3, p. 21-29, 2001.

MULCAHY, M.T. et al. Is there a monosomy 10qter syndrome?. **Clinical Genetics**, v. 21, p. 33-35, 1982

MATSUMOTO Y., et al. Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) inhibits osteoblast differentiation via Smad2/3 pathway by counteracting Smad1/5/8 signaling. **Mol Cell Endocrinol**, n.1, v.350, p. 78-86, 2012.

NAGARAJA, S.; ANSLOW, P.; WINTER, B. Craniosynostosis. **Clinical Radiology**, v.68, p. 284-292, 2013.

NACAMULI R.P., et al. Markers of osteoblast differentiation in fusing and nonfusing cranial sutures. **Plast Reconstr Surg**, n. 5, v. 112, p. 1328-1335, 2003.

NUSSBAUM, R. L.; MCLNNES, R. R.; WILLARD, H. F. **THOMPSON & THOMPSON: Genética Médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, **OMIM**. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), 2014. Disponível em: <http://omim.org>. Acesso em: Jan., 2014.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Prevenção e controle de enfermidades genéticas e os defeitos congênitos**: relatório de um grupo de consulta. Washington DC: Organização Pan-Americana da Saúde; 1984.

PAN, A., et al. A review of hedgehog signaling in cranial bone development. **Front. Physiol**, 2013

PASSOS-BUENO, M.R. et al. Genetics of Craniosynostosis: Genes, Syndromes, Mutations and Genotype-Phenotype Correlations. In: Rice, D.P. **Craniofacial Sutures. Development, Diseases and Treatment**. Front Oral Biol. Basel: Ed. Karger, 2007, v. 12, p. 107–143.

PASSOS-BUENO, M.R., FANGANIELLO, R.D. e JEHEE, F.S. Craniosynostosis and Chromosomal Alterations. In: Muenke, M. et al. **Craniosynostosis: Molecular genetics, Principles of Diagnosis, and Treatment**. Basel: Ed. Karger, 2011, v.19, p. 152-164.

PAPOULIDIS, I., et al. Prenatal detection of TAR syndrome in a fetus with compound inheritance of an RBM8A SNP and a 334-kb deletion: a case report. **Mol Med Rep**, v. 1, n. 9, p. 163-165, 2014.

PARK E.A. e POWERS G.F. Acrocephaly and caphocephaly with symmetrically distributed malformations of the extremities. **Am J Dis Child**, v. 20, p. 235-315, 1920.

PETIT, P. et al. Terminal deletion of chromosome 10q26: delineation of two clinical phenotypes. **Genet Couns.** n.4, v.9, p. 271-275, 1998.

QUEISSER-LUFT, A. et al. Malformations in newborn: results based o 30,940 infants from the Mainz congenital birth defects monitoring system. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, 266(3):163-167, 2002.

QUEISSER-LUFT, A. e SPRANGER, J. Congenital Malformations. **Dtsch Arztebl**, v. 103, n. 38, p. A 2464–71, 2006.

RAMOS J.L.A. et al. Malformações congênitas: estudo prospectivo de dois anos em três maternidades de São Paulo. **Pediatr.** (S. Paulo), n.3. p.20-28,1981.

RAMSDEN, S.C. et al. External quality assessment of rapid prenatal detection of numerical chromosomal aberrations using molecular genetic techniques: 3 years experience. **Prenat. Diagn.**, v. 27, n. 5, p. 404-408, 2007.

RAUCH A,et al.Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. **Am J Med Genet Part A**, v. 140A, p.2063–2074, 2006.

REEFHUIS J., et al. Fertility treatments and craniosynostosis: California, Georgia, and Iowa, 1993-1997. **Pediatrics**. v. 111, n. 5 pt 2, p.1163-6, May. 2003.

REEFHUIS J., et al. Use of clomiphene citrate and birth defects, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2005. **Human Reproduction**, v. 26, n. 2, p. 451-7, Feb. 2011.

RENIER, D. et al. Management of craniosynostosis. **Child's Nerv Syst**, v.16, p. 645–658, 2000.

RENIER, D., et al. Mental prognosis of Apert syndrome. **Archives of Pediatrics**, v.3, n. 8, p. 752-760, 1996.

ROCHA, A.L.B. **Sequenciamento direto dos genes SIX3,SHH,TGIF1,ZIC2 e array-CGH no estudo de pacientes com holoprosencefalia**. 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) - Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo, Bauru,2013.

RODRIGUES, R.M. **Refinamento citogenético em indivíduos com anomalias craniofaciais sindrômicas sem diagnóstico definido**. 2010. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo, Bauru, 2010.

ROSCIOLI, T. et al. Genotype and Clinical Care Correlations in Craniosynostosis: Findings From a Cohort of 630 Australian and New Zealand Patients. **American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)**, v.163 C, p.259–270, 2013.

RICE, D.P., RICE R. e THESLEFF, I. Molecular mechanisms in calvarial bone and suture development, and their relation to craniosynostosis. **Eur J Orthod**, n. 2, v.25, p. 139-148, 2003.

SAAL, H.M. Loss of the N-myc oncogene in a patient with a small interstitial deletion of the short arm of chromosome 2. **Am. J. Med. Genet.**, n.4, v.66, p. 373-377, 1996.

SABBAG, A.R.C. **Pesquisa de síndromes de microdeleção em pacientes com deficiência intelectual por meio da técnica de MLPA - Amplificação De Múltiplas Sondas Dependentes De Ligação**. 2012. 176 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

SCERBO P, et al. Ventx factors function as Nanog-like guardians of developmental potential in Xenopus. **PLoS One**, n. 7, v. 5, 2012.

SCHOUTEN J.P., et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n.12, p.57, 2002

SCHRANDER-STUMPEL, C., FRYNS, J.P. e HAMERS, G. The partial monosomy 10q syndrome: report on two patients and review of die developmental data. **Journal of Mental Deficiency Research**, v. 35, p. 259-267, 1991.

SETO, M. L., et al. Isolated sagittal and coronal craniosynostosis associated with TWIST box mutations. **Am. J. Med. Genet**, v.143a, p. 678-686, 2007.

SHAFFER, L.G., LUPSKI J.R. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. **Annu Rev Genet**, v. 34, p. 297-329, 2000.

SHAPIRO, S.D. et al. Deletions of the Long Arm of Chromosome 10. **American Journal of Medical Genetics**, v. 20, p.181-196, 1985.

SPRANGER, J.W. et al. Errors of morphogenesis: Concepts and terms. **J. Pediatr.**, v. 100, n.1, p.160-165, 1982.

STANKIEWICZ, P. BEAUDET A. L. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 17, p.182–192, 2007.

STORRE J., et al. Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2f6. **EMBO Rep**, n. 7, v. 3, p. 695-700, 2002.

SU, P.H., et al. De Novo Interstitial Deletion of Chromosome 2 (p23p24). **Pediatrics and Neonatology**, v. 52, p. 46-50, 2011.

SZAFRANSKI, P. et al. Structures and Molecular Mechanisms for Common 15q13.3 Microduplications Involving CHRNA7: Benign or Pathological?. **Hum Mutat**, v. 31, p. 840–850, 2010.

TANDON, M., et al. Runx2 mediates epigenetic silencing of the bone morphogenetic protein-3B (BMP-3B/GDF10) in lung cancer cells. **Mol Cancer**, v.11, p. 27, 2012.

TAKAO, M., et al. Identification of rat bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b), a new member of BMP-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, n. 219, p. 656–662, 1996.

TEYSSIER, M. et al. Monosomy 10qter: a new case. **Med Genet**, n. 29, p. 342-343, 1992.

TESZAS, A., et al. Expanding the clinical spectrum of MYCN-related Feingold syndrome. **Am. J. Med. Genet**, v.140A, p. 2254-2256, 2006.

TJIO, H.J. & LEVAN ,A. The chromosome numbers of man. **Hereditas**, v. 42, p.1–6, 1956.

TZETS, M. et al. The clinical utility of molecular karyotyping using high-resolution array-comparative genomic hybridization. **Expert. Rev. Mol. Diagn.** v. 12, n. 5, p. 449-457, 2012.

UEHARA, D.T. **Pesquisa de microrrearranjos em genes candidatos a surdez síndrômica e não-sindrômica**. 2010. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

VANDEPOELE, K., et al. **A novel gene family NBPF: intricate structure generated by gene duplications during primate evolution**. **Molec. Biol. Evol**, v. 22, p. 2265-2274, 2005.

VELTMAN, J.A. et al. High-Throughput Analysis of Subtelomeric Chromosome Rearrangements by Use of Array-Based Comparative Genomic Hybridization. **Am. J. Hum. Genet.** v.70, p.1269–1276, 2002.



VIRCHOW, R. Über den Kretinismus, namentlich in Franken, und über pathologische Schädelformen. **Verh Phys Med Gesellsch Wurzburg**, v. 2, p. 231-284, 1851.

VISSERS, L.E. et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. **Nat Genet.**, v. 36, p.955-957, 2004.

VISSERS, L.E. et al. Heterozygous mutations of FREM1 are associated with an increased risk of isolated metopic craniosynostosis in humans and mice. **PLoS Genet.** v. 7, 2011.

WAGGONER, D.J. et al. Partial Monosomy of Distal 10q: Three New Cases and a Review. **American Journal of Medical Genetics**, v. 86, p. 1–5, 1999.

WANG, W.,1, VAN DE WATER ,T. e LUFKIN, T. Inner ear and maternal reproductive defects in mice lacking the Hmx3 homeobox gene. **Development** , v.125, p. 621-634, 1998.

WANG, W. et al. Hmx2 and Hmx3 Homeobox Genes Direct Development of the Murine Inner Ear and Hypothalamus and Can Be Functionally Replaced by Drosophila Hmx. **Developmental Cell**, v. 7, p. 439–453, 2004.

WANG, J. et al. BMP9 Effectively Induces Osteo/Odontoblastic Differentiation of the Reversibly Immortalized Stem Cells of Dental Apical Papilla (SCAPs). **Stem Cells Dev**, 2014.

WEBER, I. et al. Molecular analysis of 74 patients with craniosynostosis. **Eur. J. Hum. Genet.** v.9, p. 179, 2001.

WILLIAMS, N.M., et al. Genome-Wide Analysis of Copy Number Variants in Attention Deficit Hyperactivity Disorder: The Role of Rare Variants and Duplications at 15q13.3. **Am J Psychiatry**, v. 169, p. 195–204, 2012.

WILKIE, A.O.M. et al. Clinical dividends from the molecular genetic diagnosis of craniosynostosis. **Am. J. Med. Genet. A**, v. 143A, p. 1941–1949, 2007.

WILKIE, A.O.M. et al. Prevalence and complications of single gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. **Pediatrics**. v.162, n.2, p.391-490, 2010.

WITTMANN, W. SCHIMMANG, T. e GUNHAGA, L. Progressive Effects of N-myc Deficiency on Proliferation, Neurogenesis, and Morphogenesis in the Olfactory Epithelium. **Developmental Neurobiology**, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global strategies to reduce the health–care burden of craniofacial anomalies**. Geneva: WHO, 2002a, 148p.

WULFSBERG, E.A. et al. Chromosome 10qter Deletion Syndrome:A Review and Report of Three New Cases. **American Journal of Medical Genetics**, v. 32, p.364-367, 1989.



YAMASAKI, K e HAGIWARA , H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. **Toxicol Lett**, n. 2-3, v. 191, p. 211-5, 2009.

YATSENKO, S.A. et al. Identification of critical regions for clinical features of distal 10q deletion syndrome. **Clin Genet**, v. 76, p. 54–62, 2009.

ZHOU, Z.Q., et al. Sequential and Coordinated Actions of c-Myc and N-Myc Control Appendicular Skeletal Development. **PLoS ONE**, n. 4, v. 6, 2011.

APENDICE A – Caracterização clínica e molecular dos cinco pacientes estudados

Paciente	Sexo	Idade nas consultas	Tipo do crânio	Evento	Tamanho (bp)	Região Cromossômica	Número de genes da região	Genes candidatos ao fenótipo	Build Genoma
1	F	1 dia; 29 dias; 13 meses e 2,2 anos	Escafocefalia	Deleção	12,967,989	10q26.12-q26.3	120	<i>FGFR2, DOCK1, PTPRE, VENTX, NKX2.1; NKX6.2; HMX2; HMX3</i>	Build 36/hg18
2	M	6 meses	Trigonocefalia	Deleção	1,509,284	1q21.1	42	<i>HYDIN2; PIAS3, HFE2, PDE4DIP</i>	GRCh37/hg19
3	M	2 anos	Trigonocefalia.	Deleção	625,393	10q11.22	14	<i>GDF10/GDF2</i>	GRCh37/hg19
4	M	1 a 10 m	Escafocefalia	Duplicação	449,881	15q13.3	2	<i>CHRNA7</i>	Build 36/hg18
5	M	9 anos	Trigonocefalia/ Escafocefalia	Deleção	9,379,554	2p25.1-p24.1	44	<i>MYCN/E2F6/SMC6/LPIN1</i>	Build 36/hg18